



# UNIVERSITÀ DI PISA

Dipartimento di Ricerca Translazionale e delle nuove  
Tecnologie in Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea Specialistica in Medicina e Chirurgia

## TESI DI LAUREA

*“Ruolo dei microRNA nel remodeling da Stenosi Valvolare  
Aortica severa”*

Relatore

*Chiar.mo Prof. Antonio Giuseppe Naccarato*

Candidato

*Matteo Passiatore*

Anno Accademico 2015/2016



# INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	<b>4</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>7</b>
1.1 LA STENOSI AORTICA	7
1.2 EZIOLOGIA E FATTORI DI RISCHIO STENOSI VALVOLARE AORTICA	8
1.3 EPIDEMIOLOGIA STENOSI VALVOLARE AORTICA	11
1.4 PATOGENESI STENOSI VALVOLARE AORTICA	12
1.4.1 L'AUMENTO DEL GRADIENTE PRESSORIO: MECCANISMO DI COMPENSO ALLA STENOSI VALVOLARE	12
1.4.2 L'IPERTROFIA MIOCARDICA: MECCANISMO DI COMPENSO ALL'AUMENTO PRESSORIO VENTRICOLARE SINISTRO	13
1.4.3 LA FUNZIONALITÀ DIASTOLICA E L'OSSIGENAZIONE MIOCARDICA NELLA STENOSI VALVOLARE AORTICA	14
1.4.4 LA FUNZIONALITÀ SISTOLICA NELLA STENOSI VALVOLARE AORTICA	15
1.4.5 LA FIBROSI MIOCARDICA	16
1.5 CLINICA STENOSI VALVOLARE AORTICA	22
1.5.1 ANAMNESI	22
1.5.2 ESAME OBIETTIVO	24
1.6 DIAGNOSI STENOSI VALVOLARE AORTICA	26
1.6.1 ESAMI STRUMENTALI	26
1.6.2 CATETERISMO CARDIACO E ANGIOGRAFIA	28
1.7 VALUTAZIONE NON INVASIVA DELLA FIBROSI CARDIACA	30
1.8 MICRORNA E PATOLOGIA CARDIOVASCOLARE	33
1.8.1 RUOLO BIOLOGICO DEI MICRORNA	33
1.8.2 RUOLO FISIOPATOLOGICO DEI MICRORNA	35
1.8.3 RUOLO DEI MICRORNA NEL PROCESSO FISIOPATOLOGICO DI FIBROSI E IPERTROFIA CARDIACA	36
1.8.4 LNCRNA E PATOLOGIA CARDIOVASCOLARE	39
1.8.5 RUOLO DIAGNOSTICO DEI MICRORNA	40
1.9 TERAPIA MEDICA STENOSI VALVOLARE AORTICA	41
1.10 TERAPIA CHIRURGICA STENOSI VALVOLARE AORTICA	42
1.10.1 INDICAZIONI ALL'INTERVENTO	42
1.10.2 LA TECNICA TAVI	42
1.10.3 LA SELEZIONE DEI PAZIENTI DA SOTTOPORRE A TAVI	45
1.10.4 NUOVI SCENARI	47
1.11 CLASSIFICAZIONE FLUSSO-GRADIENTE STENOSI VALVOLARE AORTICA	49
1.11.1 INADEGUATEZZA DEI PARAMETRI ATTUALI PER LA VALUTAZIONE DI SEVERITÀ E INDICAZIONE ALL'INTERVENTO CHIRURGICO	49
1.11.2 CLASSIFICAZIONE ALTERNATIVA FLUSSO-GRADIENTE	51
1.11.3 IMPLICAZIONI TERAPEUTICHE DELLA CLASSIFICAZIONE ALTERNATIVA FLUSSO-GRADIENTE	55

<b>2. SCOPO DELLO STUDIO</b>	<b>59</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>60</b>
<b>3.1 ECOCARDIOGRAFIA CONVENZIONALE</b>	<b>60</b>
3.2.1 VALUTAZIONE DELL'IPERTROFIA E FUNZIONALITÀ SISTOLICA VENTRICOLARE SINISTRA	61
3.2.2 VALUTAZIONE DELLA SEVERITÀ DELLA STENOSI VALVOLARE AORTICA	63
3.2.3 VALUTAZIONE DELLA FUNZIONE DIASTOLICA VENTRICOLARE SINISTRA	64
<b>3.2 SPECKLE TRACKING IMAGING</b>	<b>64</b>
<b>3.3 CATETERISMO CARDIACO</b>	<b>65</b>
<b>3.4 CAMPIONI EMATICI</b>	<b>65</b>
2.5.1 ESTRAZIONE RNA DA SANGUE INTERO	66
3.5.2 RETRO-TRASCRIZIONE RNA	68
3.5.3 REAL-TIME PCR	70
<b>3.5 ANALISI STATISTICA</b>	<b>75</b>
<b>3.6 CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE DI STUDIO</b>	<b>77</b>
<b>4.RISULTATI</b>	<b>82</b>
<b>4.1 RISULTATI ECOCARDIOGRAFIA CONVENZIONALE E 2D-STI</b>	<b>82</b>
<b>4.2 RISULTATI CAMPIONI EMATICI</b>	<b>83</b>
<b>4.3 EVIDENZE RISULTATI IN RIFERIMENTO ALLA CLASSIFICAZIONE FLUSSO-GRADIENTE</b>	<b>83</b>
<b>5.DISCUSSIONE</b>	<b>86</b>
<b>6.LIMITAZIONI</b>	<b>93</b>
<b>7.CONCLUSIONI</b>	<b>94</b>
<b>8.BIBLIOGRAFIA</b>	<b>96</b>

## **RIASSUNTO**

### *Introduzione*

*La Stenosi Valvolare Aortica (SVA) calcifica-degenerativa rappresenta la più comune valvulopatia nei paesi occidentali, l'incidenza è destinata ad aumentare a causa del progressivo incremento della durata media di vita e per il concomitante aumento della malattia aterosclerotica, cui è eziologicamente correlata.*

*La progressione dalle forme di ostruzione lieve a severa è spesso graduale e si accompagna al lento instaurarsi di alterazioni fisiopatologiche a livello ventricolare sinistro, dovute al sovraccarico pressorio, quali ipertrofia concentrica e progressiva fibrosi tissutale. Sono implicati in questo processo tanto trigger meccanici quanto fattori genetici. In particolare, la fibrosi sostitutiva contribuisce a determinare l'insorgere di disfunzione diastolica e al progressivo scadimento dell'inotropismo che sfocia in uno stato di scompenso cardiaco cronico.*

*Attualmente le indicazioni ad intervento di sostituzione valvolare sono poste in presenza di SVA di entità severa, all'insorgere di sintomi tipici o al manifestarsi di una riduzione della Frazione di Eiezione ( $FE < 50\%$ ). Tuttavia, la comparsa di sintomi e la riduzione della FE si associano ad alterazioni della contrattilità e modificazioni del tessuto miocardico a volte non reversibili dopo intervento.*

*Inoltre, i parametri emodinamici in uso per definire la severità della SVA sembrano essere limitati per la flusso-dipendenza e spesso discordanti, la FE non è un indicatore abbastanza sensibile di funzionalità sistolica e nel paziente anziano per la presenza di comorbidità è difficile correlare i sintomi alla malattia.*

*Un valido contributo, per poter meglio gestire i pazienti con SVA, potrebbe essere dato dalle nuove metodiche d'imaging e dai biomarcatori plasmatici in grado di valutare l'entità di compromissione miocardica e il remodeling da SVA sin dalle fasi precoci.*

*La biopsia endomiocardica è il gold-standard per la quantizzazione del contenuto di collagene miocardico. Tuttavia, le moderne metodiche d'imaging ecocardiografico come lo Speckle Tracking Imaging (2D-STI) consentono una valutazione accurata della deformazione miocardica e indirettamente delle alterazioni tissutali che caratterizzano questi pazienti, con buona correlazione con i dati istologici.*

*Tra i più recenti e attuali biomarcatori valutabili a livello plasmatico rientrano i microRNA (miRNA), piccoli RNA non codificanti messi in circolo tramite microvescicole, che costituiscono il pool circolante di una componente tissutale espressa in vari apparati, compreso il sistema cardiovascolare. I miRNA agiscono da modulatori negativi dell'espressione genica mediante l'inibizione della traduzione proteica per interferenza con l'RNA messaggero e dato che il loro profilo di espressione risulta alterato in diversi processi fisiopatologici inclusa la fibrogenesi, è stato supposto il loro ruolo come potenziali biomarcatori.*

*Poichè il decadimento progressivo della funzionalità ventricolare è correlato alla progressiva ipertrofia miocardica e alla fibrosi, l'utilizzo del 2D-STI e dei miRNA quali marker di fibrosi permette in maniera rapida e non invasiva di identificare sin dalle fasi precoci le lesioni tissutali. In questo modo si pone attenzione non solo agli indici valvolari o flusso-dipendenti, ma anche al miocardio e alle sue alterazioni, per ottimizzare la gestione e il trattamento dei pazienti con SVA severa.*

#### *Materiali e metodi*

*Nel nostro studio, 66 pazienti affetti da valvulopatia aortica calcifica-degenerativa con stenosi di entità severa sono stati sottoposti a valutazione clinica e laboratoristica, prima di effettuare l'intervento chirurgico.*

*E' stata eseguita una valutazione ecocardiografica convenzionale e con 2D-STI della deformazione miocardica globale.*

*In 61 pazienti è stata inoltre effettuata un'analisi dei livelli di espressione dei miRNA-21 plasmatici.*

*28 di questi soggetti sono stati sottoposti ad intervento di sostituzione valvolare aortica chirurgica e 35 hanno effettuato un intervento di impianto protesico valvolare trans-catetere. Dai dati ottenuti è stato effettuato un confronto dei pazienti in base alla classificazione alternativa della SVA severa, basata su flusso-gradiente.*

## *Risultati*

*Lo studio ecocardiografico ha rilevato una popolazione caratterizzata da ipertrofia concentrica, disfunzione diastolica e una netta compromissione della funzione miocardica longitudinale, valutata tramite metodiche ecocardiografiche convenzionali e avanzate (2D-STI), nonostante valori di FE in media preservati.*

*La componente plasmatica dei miRNA-21 è risultata correlare inversamente con il Global Longitudinal Strain (GLS).*

*Inoltre, dalla caratterizzazione dei pazienti in base alla classificazione alternativa flusso-gradiente è emersa un'aumentata espressione di miRNA-21 nei gruppi a basso flusso.*

*In conclusione, nel remodeling da SVA la fibrosi miocardica si associa ad alterazioni della deformazione miocardica globale e il miRNA-21 può avere un ruolo fibrogenico in un contesto di ipertrofia da sovraccarico pressorio.*

*Perciò l'implementazione di "marcatori" d'imaging e laboratoristici, ottenibili rapidamente e in maniera non invasiva, potenzialmente capaci di identificare le alterazioni contrattili e tissutali in fase precoce ed eventualmente pre-clinica, potrebbe contribuire ad ottimizzare la stratificazione del rischio e la strategia di gestione terapeutica dei pazienti con stenosi valvolare aortica severa.*

# 1. INTRODUZIONE

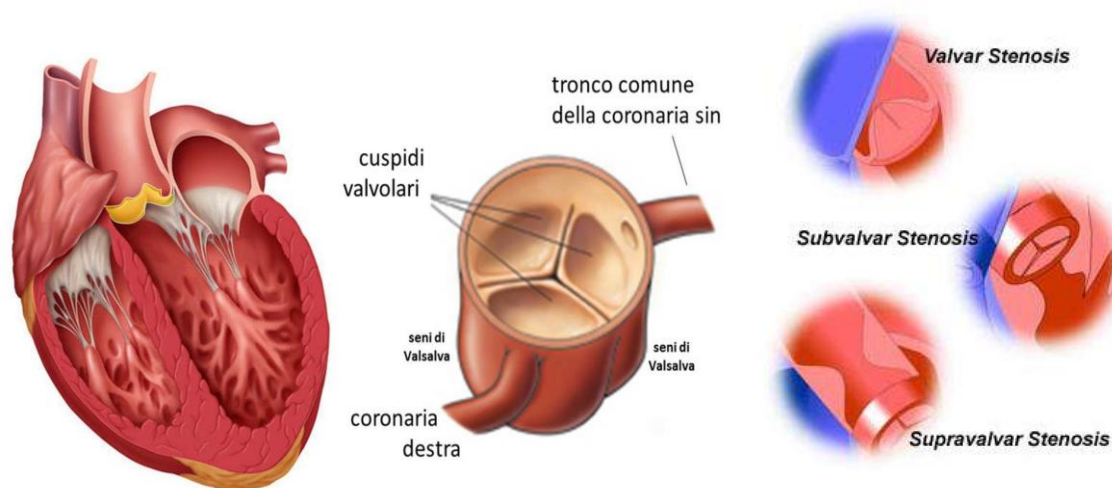
## 1.1 LA STENOSI AORTICA

La Stenosi Aortica (SA) è definita come un ostacolo al flusso di sangue durante la fase di eiezione sistolica del ventricolo sinistro che può verificarsi a livello della valvola (*valvolare*) o al di sopra (*sopra-valvolare*) o al di sotto di essa (*sotto-valvolare*).<sup>1</sup>

La *Stenosi Valvolare Aortica* (SVA) rappresenta la forma più comune di SA e consiste in un restringimento dell'Area Valvolare Aortica (AVA) che normalmente si attesta tra i 2-3 cm<sup>2</sup>. L'entità della stenosi può essere lieve se l'area dell'orifizio è compresa tra 1,5 e 2 cm<sup>2</sup>, moderata se è tra 1 e 1,5 cm<sup>2</sup> e severa quando minore di 1 cm<sup>2</sup>.<sup>2</sup>

La *stenosi sopra-valvolare* è una patologia spesso dovuta a cause congenite come la presenza di una membrana fibrosa in corrispondenza del margine superiore dei seni di Valsalva o restringimenti aortici a diaframma o clessidra allo stesso livello.

La *stenosi sotto-valvolare* è una patologia dovuta a cause congenite come la presenza di un diaframma fibroso o anello fibromuscolare che circonda il tratto di efflusso del ventricolo sinistro e a cause acquisite come lo sviluppo di cardiomiopatia ipertrofica che comporta un restringimento dello stesso tratto.<sup>3</sup>

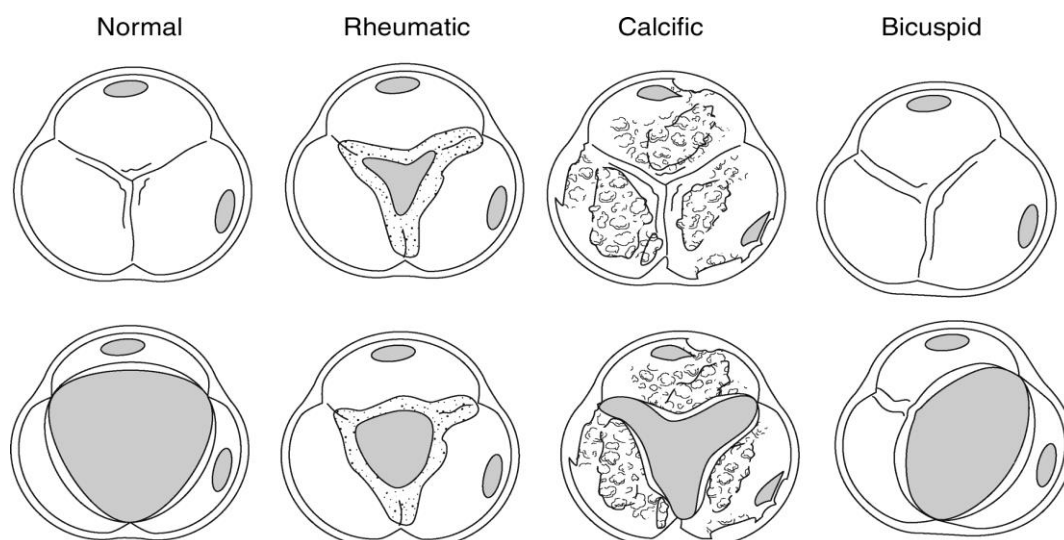


**Figura 1:** forme di ostruzione all'efflusso ventricolare sinistro nella stenosi aortica.



## 1.2 EZIOLOGIA E FATTORI DI RISCHIO STENOSI VALVOLARE AORTICA

Le cause più comuni di SVA si dividono in congenite come le malformazioni valvolari e acquisite come la calcificazione degenerativa o la cardiopatia reumatica cronica.



*Figura 2: cause più comuni di stenosi valvolare aortica.*

La *SVA congenita* consiste in una malformazione della valvola aortica che può presentarsi come valvola monocuspide, bicuspide o tricuspide.

- La valvola monocuspide provoca un'ostruzione grave fin dall'infanzia e rappresenta la malformazione più frequentemente osservata nella stenosi aortica valvolare fatale, nei bambini di età inferiore a un anno. Morfologicamente consiste in una valvola intrinsecamente stenotica che si presenta come un'unica commisura a cupola con orifizio eccentrico.

- La valvola bicuspide può essere stenotica sin dalla nascita, ma nella maggior parte dei casi non è responsabile di gravi restringimenti dell'orifizio aortico durante l'infanzia. La maggior parte dei pazienti ha normali funzioni valvolari fino all'età adulta, momento in cui avvengono processi di calcificazione e conseguente ostruzione della valvola. La valvola bicuspide congenita, in seguito all'anomalia strutturale, determina la turbolenza del flusso sanguigno con danneggiamento dei lembi valvolari e conseguente sviluppo di fibrosi, rigidità e calcificazioni sulle cuspidi e commissure che comportano imperfetta apertura valvolare.

Morfologicamente le cuspidi non sono equivalenti e la cuspidi di dimensione maggiore ha un rafe mediano che deriva dall'incompleta separazione commissurale durante lo sviluppo. Meno frequentemente le cuspidi sono di dimensioni identiche e il rafe è assente.

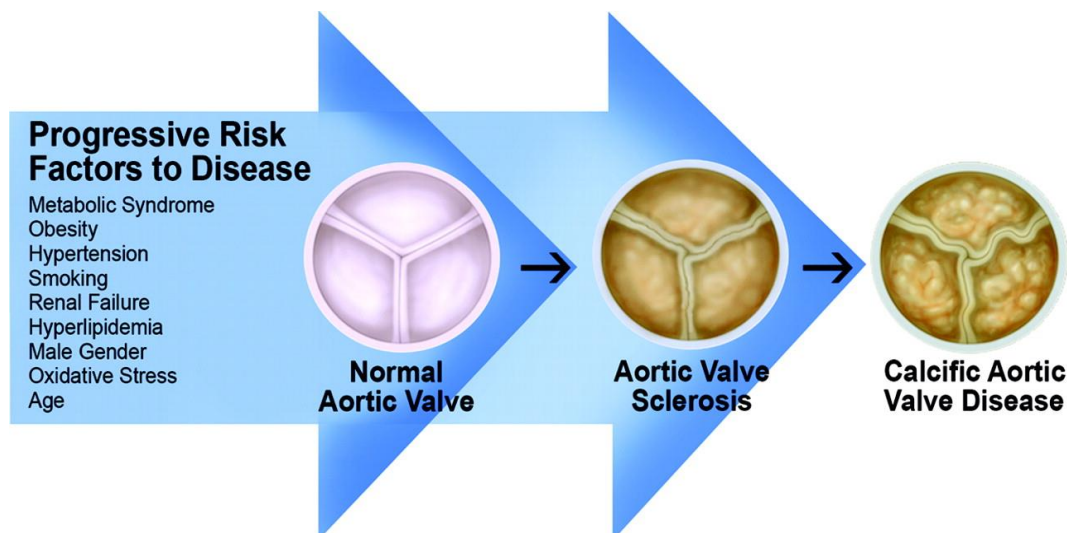
- La valvola tricuspidale asimmetrica nella maggior parte dei casi consente una normale funzione per tutta la vita, tuttavia anche in questo caso il flusso turbolento prodotto dalla lieve anomalia congenita può portare a fibrosi e con il tempo a calcificazione e stenosi, quindi alterazioni simili a quanto osservato per la valvola bicuspidale. Morfologicamente la valvola si presenta con cuspidi di differenti dimensioni e qualche fusione commissurale.<sup>4</sup>

La *SVA reumatica cronica* è una patologia acquisita e rappresenta l'esito di alterazioni anatomiche che si sviluppano in seguito a febbre reumatica. La febbre reumatica è una patologia infiammatoria acuta immunomediata, multisistemica che si presenta alcune settimane dopo l'episodio di faringite da streptococco di gruppo A. La cardite reumatica è una manifestazione frequente durante la fase attiva della febbre reumatica, che con il tempo può progredire a cardiopatia reumatica cronica. Quest'ultima si caratterizza per anomalie valvolari in particolare mitraliche ed eventualmente aortiche (i pazienti con SVA reumatica presentano spesso un concomitante interessamento mitralico).

Morfologicamente la SVA reumatica cronica è caratterizzata da aderenze e fusioni delle commissure e cuspidi e dalla vascolarizzazione dei lembi e dell'anello valvolare, condizioni che comportano la retrazione e irrigidimento dei bordi liberi delle cuspidi. Si sviluppano inoltre noduli calcifici su ambedue le superfici e l'orifizio si riduce a una piccola apertura rotonda o triangolare, di conseguenza la valvola reumatica è spesso insufficiente oltre che stenotica.<sup>5</sup>

La *SVA calcifica-degenerativa* è anch'essa una patologia acquisita che si presenta tipicamente nei pazienti anziani più spesso oltre i 65 anni ed è la causa più frequente di sostituzione valvolare. In passato la calcificazione valvolare aortica era attribuita alla degenerazione da logoramento per lo stress meccanico e l'accumulo distrofico e passivo di sali di calcio sulla valvola in origine naturale. Attualmente si afferma la teoria secondo cui il processo patologico è un processo attivo che condivide caratteristiche fisiopatologiche con l'aterosclerosi. Esso è caratterizzato da alterazioni proliferative, infiammatorie e accumulo di lipidi che causano in ultima analisi la progressiva deposizione di calcio con conseguente ridotta mobilità dei lembi.<sup>6 - 7</sup>

Nel Cardiovascular Health Study, Stewart et al. hanno evidenziato come diversi fattori di rischio della malattia aterosclerotica vascolare quali l'età, il sesso maschile, il peso, il fumo, la storia d'ipertensione, diabete, elevati livelli di LDL, colesterolo e lipoproteine, fossero correlati alla SVA calcifica.



**Figura 3:** fattori di rischio correlati alla stenosi valvolare aortica calcifica-degenerativa.<sup>8</sup>

Nello stesso studio è stato rilevato come l'incidenza di eventi cardiovascolari avversi nei pazienti affetti da SVA calcifica fosse maggiore; in particolare il rischio dei pazienti con stenosi aortica rispetto ai pazienti con sclerosi aortica è aumentato del 66% per mortalità cardiovascolare, del 46% per infarto miocardico acuto e del 33% per scompenso cardiaco.<sup>9</sup>

Inoltre, la stessa patologia è stata messa in relazione con marcatori dell'infiammazione e componenti della sindrome metabolica.<sup>10</sup>

Tuttavia, è chiaro che il danno valvolare della stenosi aortica calcifica differisce in vari aspetti dall'aterosclerosi. In particolare, anziché accumulare cellule muscolari lisce, le valvole patologiche contengono cellule somiglianti a osteoblasti che sintetizzano proteine della matrice ossea e promuovono la deposizione di sali di calcio.

L'aspetto morfologico caratteristico della SVA è caratterizzato dalla presenza nelle cuspidi di piccole masse calcifiche che protrudono all'interno dei seni di Valsalva, impedendo così l'apertura della valvola durante l'efflusso. A differenza della forma di origine reumatica, i depositi di calcio alterano l'architettura delle cuspidi soprattutto in prossimità dei margini d'inserzione, nella parte fibrosa della valvola, non interessando i margini liberi e non avvengono pertanto fusioni delle commissure. La fase iniziale del processo non è significativa dal punto di vista emodinamico e prende il nome di sclerosi aortica.

Microscopicamente si osserva la presenza d'infiltrato infiammatorio cronico con linfociti T e macrofagi, depositi lipidici nella sede della lesione e nelle adiacenze della zona fibrotica e ispessimento fibrotico con collagene ed elastina. L'accumulo di calcio extracellulare si verifica precocemente nel processo patologico e con il progredire della patologia si accumula ulteriormente sino alla formazione di franche aree calcifiche nelle fasi avanzate.<sup>11</sup>

### 1.3 EPIDEMIOLOGIA STENOSI VALVOLARE AORTICA

La SVA costituisce oggi la patologia valvolare di più comune riscontro in Italia e nel resto dei paesi industrializzati.

Si manifesta principalmente come stenosi aortica calcifica-degenerativa in adulti di età avanzata (prevalenza 2-7% della popolazione sopra i 65 anni).

Le stime epidemiologiche più recenti condotte in Europa e negli Stati Uniti mostrano una prevalenza di stenosi aortica moderata-severa nel 4,6% della popolazione con età maggiore di 75 anni, e raggiunge l'8,1% dopo gli 85 anni.<sup>12</sup>

Negli ultimi decenni si è verificato un notevole incremento d'incidenza della forma degenerativa. Questo cambiamento è legato al marcato declino della prevalenza del reumatismo articolare acuto, al concomitante incremento della durata media di vita della popolazione e all'aumentata prevalenza della malattia aterosclerotica cui è eziologicamente correlata.<sup>13</sup>

In uno studio svolto alla Mayo Clinic nel 1987, si osservò in un periodo di 5 anni, una riduzione dal 30% al 18% dell'eziologia reumatica e incremento dal 30% al 46% di quella calcifica degenerativa.<sup>14</sup>

L'Euro Heart Failure Survey Programme, su di una popolazione di 46000 pazienti con scompenso cardiaco, ha stimato un'eziologia degenerativa calcifica nell'81,9% dei pazienti, una genesi reumatica nell'11,2% e una congenita nel 5,6%.<sup>15</sup>

Contestualmente a questa modifica radicale dell'epidemiologia delle valvulopatie si è assistito, grazie anche ai miglioramenti delle tecniche chirurgiche e della qualità delle terapie intensive post-operatorie, a un progressivo allungamento dell'età limite in cui è possibile porre indicazione all'intervento di sostituzione valvolare.

L'Euro Heart Survey Programme ha evidenziato che circa un terzo dei pazienti con valvulopatia d'interesse chirurgico spesso non viene operato per la presenza di comorbidità. Queste ultime nel paziente anziano sono significativamente frequenti e gravi: si presentano coronaropatia nel 30-60% dei casi, insufficienza renale nel 4-11%, ictus nell'11-19%, arteriopatia periferica nel 9%, diabete mellito nell'11-21%.

Lo sviluppo di nuove tecniche come l'impianto trans-catere di protesi aortica valvolare (Trans-catheter Aortic Valve Implantation, TAVI) dà la possibilità di impiantare una protesi aortica per via percutanea, rendendo disponibile un trattamento efficace per una larga parte dei pazienti ad alto rischio non operabili.<sup>16</sup>

## 1.4 PATOGENESI STENOSI VALVOLARE AORTICA

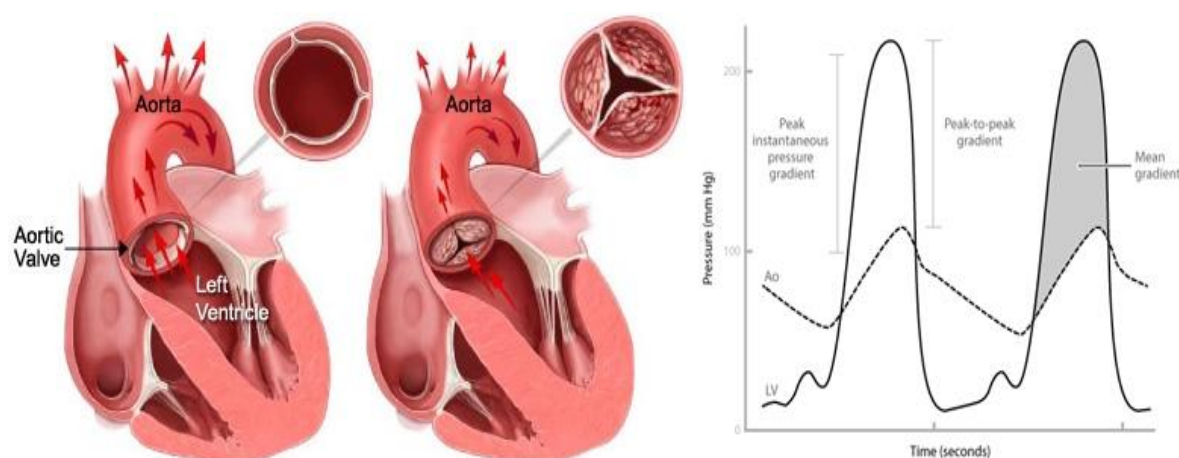
### 1.4.1 L'aumento del gradiente pressorio: meccanismo di compenso alla stenosi valvolare

La SVA è definita come un ostacolo al flusso di sangue durante la fase di eiezione sistolica del ventricolo sinistro, per una riduzione dell'AVA.

Seguendo la legge di Gorlin<sup>a</sup>, per mantenere un adeguato flusso attraverso l'area valvolare stenotica e una gittata sistolica performante, la pressione nel ventricolo sinistro in sistole deve essere superiore alla pressione vigente in aorta, generando un elevato gradiente pressorio trans-valvolare.<sup>17</sup>

Solitamente una grave ostruzione all'efflusso del ventricolo sinistro è caratterizzata da:

- orifizio aortico eiettivo inferiore a 1 cm<sup>2</sup> (o minore di 0,6 cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup> se indicizzato per la superficie corporea);
- gradiente pressorio trans-valvolare sistolico medio maggiore di 40 mmHg (calcolabile quando l'area valvolare si riduce di almeno il 50% rispetto al normale);
- velocità di picco trans-valvolare aortico maggiore di 4 cm/s.<sup>18</sup>



**Figura 4:** ostruzione all'efflusso ventricolare sinistro e conseguente sviluppo del gradiente trans-valvolare tra ventricolo e aorta.

<sup>a</sup> La legge di Gorlin afferma che:

$$\text{Area valv. (cm}^2\text{)} = \frac{\text{Gittata card. (} \frac{\text{ml}}{\text{min}} \text{)}}{\text{Freq. card. (} \frac{\text{batt}}{\text{min}} \text{)} \cdot \text{Eiezione sist. (s)} \cdot 44.3 \cdot \sqrt{\text{Gradiente medio (mmHg)}}}$$

L'area valvolare è direttamente proporzionale al flusso trans-valvolare e inversamente proporzionale alla radice quadrata del gradiente pressorio trans-valvolare. Per mantenere un adeguato flusso trans-valvolare in seguito alla riduzione dell'area, occorre aumentare il gradiente pressorio e quindi anche la pressione in cavità ventricolare sinistra.

#### 1.4.2 L'ipertrofia miocardica: meccanismo di compenso all'aumento pressorio ventricolare sinistro

L'innalzamento della pressione nel ventricolo sinistro determina un maggior stress di parete. Seguendo la legge di Laplace<sup>b</sup>, come meccanismo di compenso per ridurre lo stress e migliorare l'efficienza contrattile, si sviluppa ipertrofia miocardica con ispessimento parietale non associato a dilatazione delle camere ventricolari (*ipertrofia concentrica*).<sup>19 - 20</sup>

L'ipertrofia miocardica che ne deriva si caratterizza per una crescita quantitativa delle cellule con aumento del numero delle fibrille, dei sarcomeri e dei mitocondri e una variazione qualitativa delle proteine che vengono sintetizzate.

Le modifiche quantitative sono legate soprattutto all'attivazione di pro-oncogeni come c-fos e c-myc, che fanno parte del normale meccanismo regolatore della crescita e divisione cellulare.

Le modifiche qualitative consistono nella sintesi di varianti delle proteine contrattili con riattivazione della sintesi delle isoforme fetali (finalizzata al risparmio energetico sebbene a prezzo di una minore funzionalità) e a variazioni nella produzione di una maggiore quantità di collagene interstiziale dovuto all'aumentata attività fibroblastica.

Tuttavia, non tutti i pazienti sono in grado di sviluppare livelli d'ipertrofia tali da compensare il sovraccarico pressorio, pertanto in questi soggetti potrebbero insorgere precocemente la dilatazione del ventricolo e la riduzione della frazione di eiezione. Presumibilmente il potenziale d'ipertrofia miocardica è differente in ogni paziente.<sup>21</sup>

---

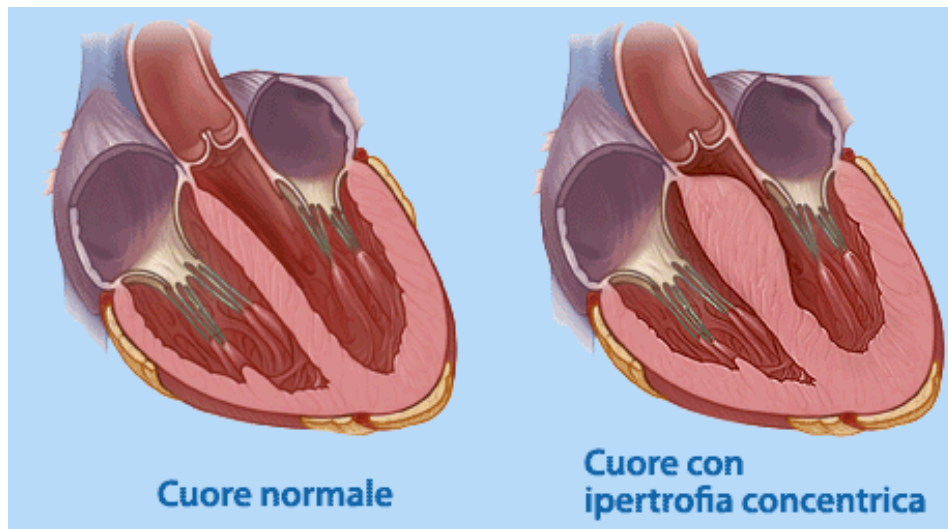
<sup>b</sup> La legge di Laplace afferma che:

$$Sp=PR/2S$$

Con Sp stress di parete, P pressione endocavitaria, R raggio della cavità e S spessore di parete.

Lo stress di parete è direttamente proporzionale alla pressione della cavità ventricolare e al raggio della stessa e inversamente proporzionale allo spessore di parete, quindi per ridurre lo stress di parete in seguito ad aumenti pressori all'interno del ventricolo occorrerà aumentare lo spessore di parete.





**Figura 5:** differenza tra un cuore normale e un cuore con sviluppo di ipertrofia concentrica.

#### *1.4.3 La funzionalità diastolica e l'ossigenazione miocardica nella stenosi valvolare aortica*

L'ipertrofia comporta due costi cioè la riduzione della compliance del ventricolo sinistro e l'inappropriata ossigenazione miocardica.

Il ventricolo sinistro ipertrofico determina un'aumentata resistenza al riempimento sia per la crescita quantitativa delle fibre miocardiche che per la fibrosi a essa associata. Si viene quindi a creare un aumento della pressione telediastolica che potrebbe alterare la funzionalità diastolica ventricolare. Tuttavia, una contrazione atriale più vigorosa (funzione booster della pompa atriale) permette l'apporto sanguigno richiesto e la lunghezza delle fibre necessaria per una gittata sistolica adeguata: la contrazione atriale riveste un ruolo determinante nei pazienti con stenosi aortica, perciò situazioni come fibrillazione atriale o blocchi atrio-ventricolari potrebbero alterare questo precario equilibrio.<sup>22 - 23</sup>

L'inappropriata ossigenazione miocardica è dovuta sia alla maggiore richiesta di ossigeno per l'aumentata massa muscolare che alla ridotta perfusione miocardica in seguito a pressioni endocavitarie aumentate, tempo di eiezione prolungato e compressione esercitata dal miocardio ipertrofico sulle coronarie.<sup>24</sup>

#### 1.4.4 La funzionalità sistolica nella stenosi valvolare aortica

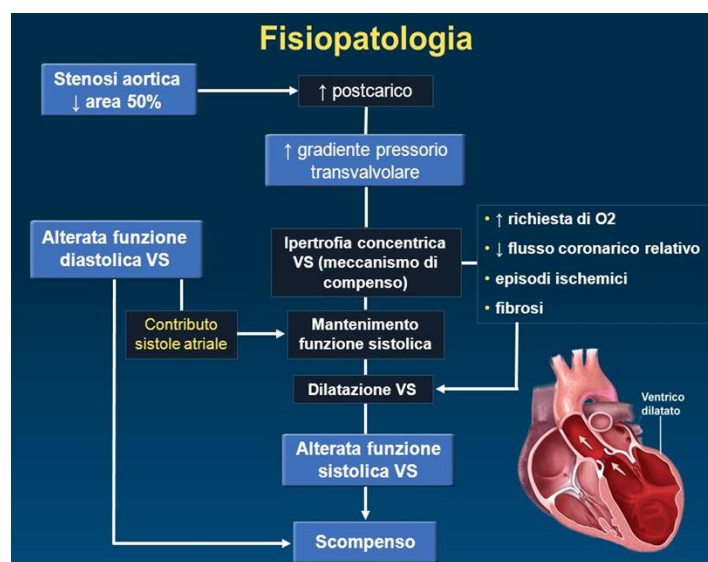
Nella maggior parte dei pazienti portatori di SVA la funzione sistolica del ventricolo sinistro è preservata per anni grazie ai meccanismi di compenso. Tuttavia, con il progredire della patologia la gittata sistolica può non essere adeguatamente sostenuta durante lo sforzo. Infatti lo sforzo fisico rappresenta la situazione più comune capace di alterare gli equilibri dei meccanismi di compenso cardiaci in un paziente con stenosi, dato che determina l'ulteriore aumento della pressione ventricolare sinistra per mantenere un flusso adeguato agli organi periferici e l'aumento del consumo di ossigeno a livello miocardico.<sup>25 - 26</sup>

In uno stadio avanzato della patologia purtroppo, si assiste al venir meno dell'efficacia dei meccanismi di compenso e allo squilibrio tra riserva di precarico e il post-carico con compromissione della funzionalità di pompa ventricolare sinistra (*afterload mismatch*). Questa fase generalmente coincide con il determinarsi di una stenosi aortica severa e la comparsa di sintomi.

Nel dettaglio, quando nella stenosi aortica la funzione ventricolare sinistra rischia di diminuire, si verifica un incremento del volume telediastolico ventricolare sinistro che comporta un aumento della riserva di precarico (*preload reserve*) e l'incremento dello stress parietale sistolico con ipertrofia miocardica compensatoria. La gittata sistolica in questa prima fase è mantenuta. Con la progressione della stenosi aortica il post-carico (*afterload*) continua ad aumentare, la riserva del precarico si esaurisce quindi la gittata sistolica si riduce e le pressioni di riempimento ventricolare e polmonare aumentano notevolmente.<sup>27 - 28</sup>

All'*afterload mismatch* si associa una progressiva e irreversibile degenerazione contrattile miocardica che sfocia in insufficienza cardiaca con scarse possibilità di recupero anche dopo sostituzione valvolare. Il processo mal adattativo si verifica per riduzione della densità capillare, morte cellulare per apoptosi e soprattutto fibrosi sostitutiva con esiti degenerativi pressoché definitivi.<sup>29</sup>





**Figura 6:** progressione di eventi fisiopatologici nella stenosi valvolare aortica.

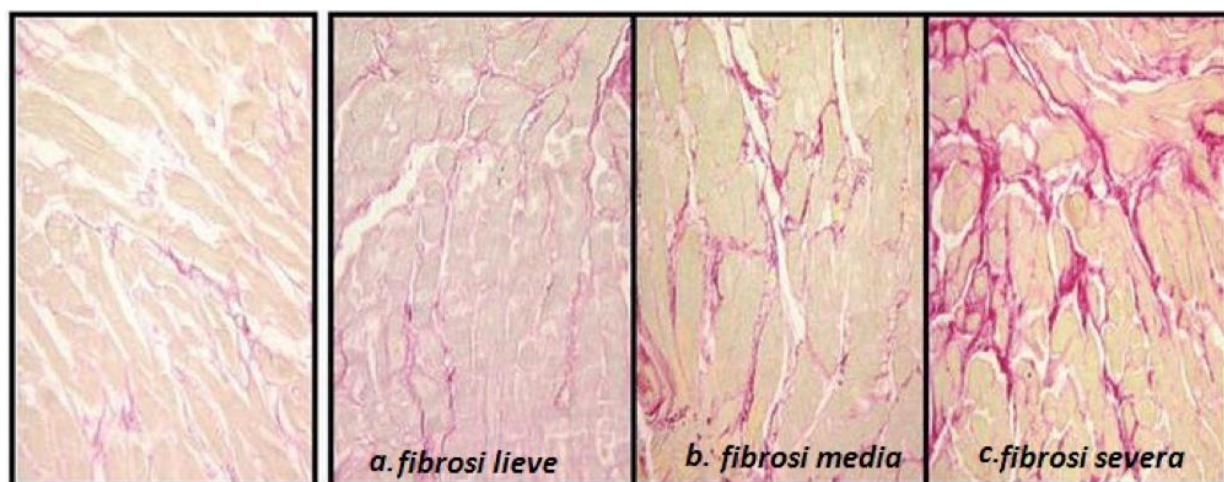
Quindi se il paziente è sottoposto a impianto valvolare aortico, nel caso in cui la degenerazione miocardica pre-operatoria non è troppo severa, la gittata sistolica subisce un notevole miglioramento per la riduzione del post-carico, ma se è già insorto un danno miocardico non si ottengono buoni risultati terapeutici.

Di conseguenza diventa cruciale la decisione del timing di sostituzione valvolare. Purtroppo non è semplice differenziare una funzione ventricolare sinistra depressa da afterload mismatch o da danno miocardico.<sup>30 - 31</sup>

#### 1.4.5 La fibrosi miocardica

Nel processo ipertrofico che accompagna un sovraccarico pressorio oltre alle alterazioni a carico dei cardiomiociti, si assiste al rimodellamento strutturale e biochimico dell'interstizio cardiaco, principalmente promosso da un alterato comportamento dei fibroblasti, cellule responsabili della sintesi del collagene. Il rimodellamento della matrice extracellulare attraverso la deposizione di collagene è una manifestazione patologica precoce e rappresenta inoltre un fattore centrale nella progressione della patologia. Infatti la deposizione di collagene esita in un quadro di fibrosi la cui entità può essere estremamente variabile, ma tende ad essere più omogenea all'instaurarsi della disfunzione sistolica.<sup>32 - 33</sup>

La fibrosi comporta un'aumentata rigidità (*stiffness*) e favorisce la disfunzione miocardica: viene compromessa la funzionalità diastolica e sistolica, favorita la progressione verso lo scompenso, morte cardiaca improvvisa e contribuisce inoltre alla creazione di un importante substrato pro-aritmogeno.<sup>34</sup>



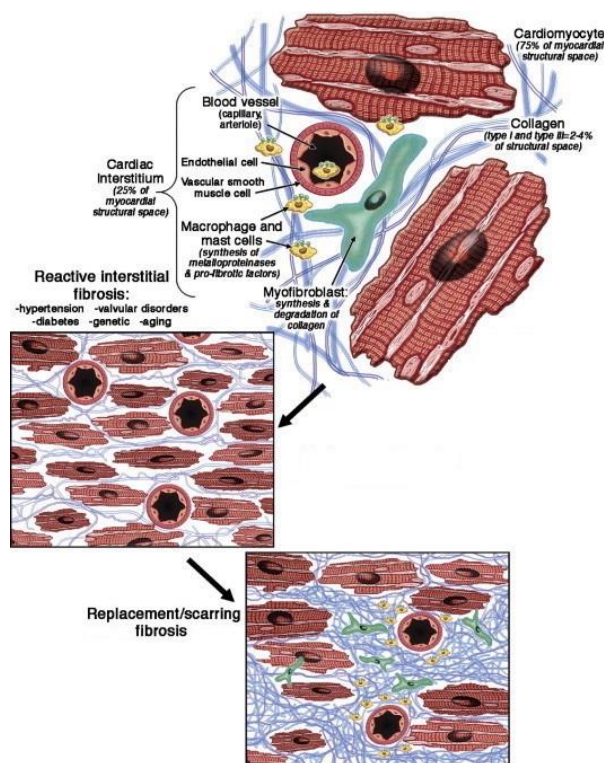
**Figura 7:** Sviluppo dei diversi gradi di fibrosi miocardica a seguito del sovraccarico pressorio in corso di stenosi valvolare aortica.

Nel dettaglio, i fibroblasti secernono proteine di matrice, incluso il collagene fibrillare di tipo I e di tipo III. Il collagene di tipo I è solitamente presente sotto forma di fibre spesse, atte a fornire resistenza alle forze di tensione; il collagene di tipo III si presenta invece come un reticolato formato dall'unione di fibre sottili, maggiormente distendibili rispetto alle fibre del collagene di tipo I e responsabili del mantenimento dell'integrità strutturale del miocardio. Durante il rimodellamento dell'interstizio cardiaco si assiste dapprima all'aumento della matrice interstiziale proporzionale alle dimensioni dei cardiomiociti, che permette di mantenere in equilibrio la composizione strutturale dei ventricoli. Successivamente si verifica un rimodellamento biochimico e strutturale caratterizzato da un notevole accumulo di collagene che esita in fibrosi. La fibrosi e le concomitanti alterazioni della qualità di collagene (diminuzione del collagene di tipo I rispetto al tipo III) sono dannose per l'organizzazione strutturale e funzionale dei cardiomiociti, nonché per il globale comportamento meccanico ed elettrico degli atri e dei ventricoli.<sup>35 - 36</sup>

L'aumento del contenuto di collagene è dovuto sia ad aumentata attività metabolica dei fibroblasti che a ridotta degradazione del collagene stesso. Perciò il fenomeno fibrotico non deve essere collegato al solo aumento della matrice interstiziale, ma anche a variazioni del "turn-over", quindi a modificazioni nella sintesi e degradazione del collagene e suoi derivati. L'accumulo patologico di collagene ha diverse evidenze morfologiche: le fibre di nuova formazione possono localizzarsi nello spazio peri-vascolare oppure interstiziale dando luogo a fibrosi di tipo *reattiva/interstiziale*, mentre in una fase tardiva si assiste a fibrosi

*sostitutiva/riparativa* che si sviluppa sotto forma di microscopiche cicatrici che vanno a sostituire la perdita di cellule parenchimali.<sup>37 - 38</sup>

L'accumulo di fibrille di collagene nello spazio interstiziale è stato attribuito: a fattori di crescita prodotti in risposta alla pressione meccanica come il Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ); a fattori originati dalla circolazione o dalle pareti vascolari come angiotensina II o l'endotelina; all'alterato bilancio tra metallo-proteasi e loro inibitori.<sup>39 - 40 - 41</sup>



**Figura 8:** deposizione di collagene con sviluppo graduale da fibrosi interstiziale a fibrosi sostitutiva.

Diversi tipi di cellule sono coinvolte nel fenomeno di fibrosi cardiaca, in maniera *diretta* con la produzione di proteine di matrice (fibroblasti) o *indiretta* secernendo mediatori fibrogenici (macrofagi, mastociti, linfociti, cellule endoteliali). L'evento cellulare chiave che guida la risposta fibrotica è la trans-differenziazione di fibroblasti in cellule secretorie e contrattili, definite miofibroblasti.

L'abbondanza di *fibroblasti* nel miocardio e la marcata produzione di mediatori promuoventi la trans-differenziazione conseguente a danno cardiaco, suggeriscono che l'attivazione di fibroblasti cardiaci residenti rappresenti la principale fonte di fibrosi.<sup>42</sup>

Altre fonti di miofibroblasti possono derivare da fibroblasti circolanti, originanti dal midollo osseo, da cellule epiteliali epicardiche o cellule endoteliali.

Indipendentemente dalla loro provenienza sono diversi i fattori implicati nella transdifferenziazione: primo il TGF- $\beta$  che attraverso l'attivazione della cascata di segnale SMAD3 nell'interstizio cardiaco promuove la trascrizione di  $\alpha$ -SMA nei fibroblasti (isoforma dell'actina correlata con l'attivazione miofibroblastica); secondo l'alterazione della composizione e delle proprietà meccaniche di matrice extracellulare che modulando la trasduzione del segnale di fattori di crescita; terzo l'espressione di recettori sulla superficie cellulare, come le integrine, importanti per la trasduzione del segnale nei fibroblasti cardiaci.<sup>43</sup>

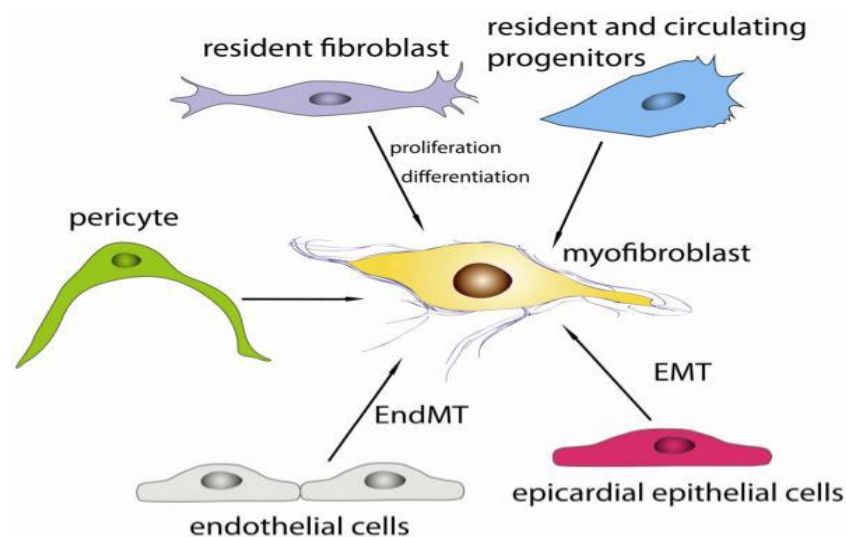
Diversi studi evidenziano che i *monociti-macrofagi* sono implicati nella regolazione della risposta fibrotica, infatti non solo svolgono un ruolo importante nell'insorgenza e nello sviluppo delle risposte fibrotiche, ma possono anche mediare la risoluzione della fibrosi. Queste cellule possono regolare la fibrosi differenziandosi in miofibroblasti, funzionando come fonte di citochine e fattori di crescita con proprietà fibrogenica (TGF- $\beta$ , PDGF, FGF) e secernendo proteasi che partecipano al rimodellamento della matrice. Inoltre, attraverso le loro proprietà macrofagiche possono contribuire al processo fibrotico rimuovendo le cellule necrotiche e facilitando la crescita dei fibroblasti riparatori, ma possono anche contrastare la fibrosi rimuovendo i miofibroblasti apoptotici e i residui di matrice.<sup>44</sup>

Anche i *mastociti* sono implicati nel fenomeno di fibrosi miocardica. Il miocardio normale è popolato da mastociti chimasi e triptasi positivi che presentano un distinto fenotipo immunologico e biochimico. La fibrosi cardiaca è associata a maggiore accumulo di mastociti che immagazzinano nei loro granuli una grande varietà di mediatori pro-infiammatori e fibrogenici. Queste cellule attivate rilasciano una grande varietà di mediatori immagazzinati nei granuli, citochine e fattori che stimolano la proliferazione dei fibroblasti e la sintesi del collagene nel cuore. Oltre al rilascio di molecole come TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL4, FGF, PDGF, sintetizzate anche da altre cellule coinvolte nella processo fibrotico come macrofagi e linfociti, i mastociti rilasciano prodotti specifici propri, cioè le proteasi chimasi e le triptasi che rappresentano un contributo unico dei mastociti alla risposta fibrotica e al rimodellamento della matrice extracellulare. La chimasi dei mastociti esercita un'azione fibrogenica stimolando la produzione di angiotensina II e l'attivazione di segnali indotti da TGF- $\beta$  e dipendenti da SMAD. La triptasi stimola la proliferazione e sintesi di collagene attivando la via di segnale ERK-MAPK e favorisce l'espressione di collagene attraverso l'attivazione del recettore PAR-2.<sup>45 - 46</sup>

Le *cellule T helper CD4+* sono implicate nella patogenesi di una vasta gamma di condizioni fibrotiche. La differenziazione cellulare Th2 è associata con una marcata sovra-regolazione della citochine pro-fibrotiche IL-4 e IL-13, entrambe potenti stimolatori della sintesi del collagene derivato da fibroblasti. Inoltre, le citochine Th2 guidano la differenziazione dei macrofagi verso un fenotipo M2, aumentando ulteriormente le risposte fibrogeniche. Anche se il ruolo delle cellule Th2 nella patogenesi della fibrosi epatica e polmonare è ormai consolidato, mancano prove dirette del suo coinvolgimento nella fibrosi cardiaca.<sup>47</sup>

Il coinvolgimento delle *cellule endoteliali* nella fibrosi cardiaca è suggerito dalla frequente coesistenza di risposte fibrotiche e angiogeniche e dalla frequente insorgenza di fibrosi perivascolare in condizioni fisiopatologiche associate a sovraccarico pressorio. Le cellule endoteliali possono favorire la fibrosi cardiaca attraverso tre meccanismi: primo esprimono mediatori pro-fibrotici (TGF- $\beta$ , FGF, ET-1); secondo rilasciano citochine e chemiochine pro-infiammatorie, favorendo in tal modo il richiamo di macrofagi e linfociti ad azione fibrogenica; terzo tramite una transizione da cellule endoteliali a cellule mesenchimali contribuiscono direttamente all'accumulo di fibroblasti nel cuore fibrotico. Tuttavia, oltre all'azione pro-fibrotica le cellule endoteliali possono produrre anche mediatori anti-fibrotici come IP-10, CXCL10 e IFN- $\gamma$ .<sup>48</sup>

I *cardiomiociti* possono avere un ruolo nello sviluppo di fibrosi cardiaca. Un crescente numero di studi suggerisce che in condizioni di stress i cardiomiociti vitali favoriscono la fibrosi attivando i fibroblasti interstiziali. Tuttavia, le cascate molecolari responsabili di questi effetti sono poco conosciute, probabilmente un ruolo cruciale su queste cellule è svolto dal TGF- $\beta$ .<sup>49</sup>



**Figura 9:** diverse possibili origini dei miofibroblasti durante il processo di fibrosi cardiaca.<sup>50</sup>

Oltre alla deposizione di collageni fibrillari, la matrice extracellulare nel rimodellamento cardiaco presenta alterazioni dinamiche nella sua composizione. Durante le prime fasi della risposta fibrotica si verifica lo stravasamento di proteine plasmatiche, che creano una rete provvisoria di matrice composta da fibrina e fibronectina stimolante la migrazione dei fibroblasti e l'attivazione delle integrine.

La matrice provvisoria favorisce anche la trans-differenziazione dei miofibroblasti, attraverso l'induzione e la secrezione di proteine *matrice-cellulari* nello spazio interstiziale. Le proteine matrice-cellulari sono una famiglia di macromolecole extracellulari che non fanno parte della normale matrice del tessuto, ma sono transitoriamente sovra-esprese in seguito a lesione. Queste generalmente non svolgono un ruolo strutturale, ma funzionano come ponti molecolari tra le proteine della matrice e le cellule, trasducendo o modulando le risposte delle citochine e dei fattori di crescita.<sup>51 - 52</sup>

## 1.5 CLINICA STENOSI VALVOLARE AORTICA

### 1.5.1 Anamnesi

I sintomi cardinali della SVA acquisita sono rappresentati da dispnea, angina, sincope e infine compaiono i segni tipici dallo scompenso cardiaco.

Tipicamente questi sintomi compaiono tardivamente, oltre i 70 anni, dopo un lungo periodo di latenza clinica durante il quale si verifica una progressiva ostruzione all'efflusso e un aumento del carico pressorio sul miocardio, mentre il paziente rimane asintomatico.

Molti pazienti ora sono diagnosticati prima dell'insorgenza dei sintomi, sulla base del ritrovamento di soffi sistolici all'esame obiettivo e conferma ecocardiografica.

L'*Angina pectoris* si verifica nei due terzi dei pazienti con stenosi severa e tende a precipitare con lo sforzo ed essere attenuata a riposo. Nei pazienti senza coronaropatia, l'angina deriva dall'aumentata richiesta di ossigeno nel miocardio ipertrofico e dalla riduzione dell'apporto secondaria a eccessiva compressione dei vasi coronarici, mentre nei pazienti con coronaropatia altra causa possibile è l'ostruzione coronarica.<sup>53</sup>

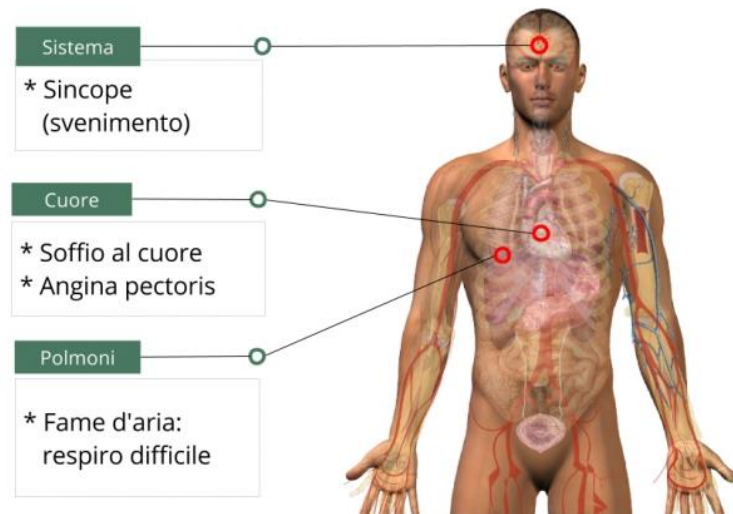
La *sincope* è più spesso dovuta alla riduzione della perfusione cerebrale che si verifica durante lo sforzo. In questa circostanza la pressione arteriosa sistemica diminuisce in conseguenza della vasodilatazione, mentre la portata cardiaca rimane fissa. Sono frequenti i sintomi premonitori della sincope come brevi episodi di obnubilamento visivo o vertigini da sforzo.

La sincope a riposo può essere anche dovuta alle aritmie come fibrillazione ventricolare transitoria dalla quale il paziente si riprende spontaneamente, fibrillazione atriale transitoria con perdita del contributo atriale al riempimento ventricolare sinistro e conseguente brusca caduta della portata cardiaca, blocco atrio-ventricolare transitorio dovuto all'estensione dei depositi calcarei dalla valvola aortica al sistema di conduzione.<sup>2</sup>

La *dispnea* è dovuta all'incremento della pressione capillare polmonare provocato dall'aumento della pressione telediastolica del ventricolo sinistro, a causa della ridotta compliance ventricolare. La dispnea da sforzo, l'ortopnea e la dispnea parossistica notturna sono dovute a diversi gradi d'ipertensione venosa polmonare e sono caratteristiche delle fasi più avanzate.



Oltre a tali sintomi, nelle fasi più avanzate della malattia, possono comparire segni dello scompenso cardiaco, quali edemi periferici, epatomegalia e ritenzione idrica salina.<sup>54</sup>



**Figura 10:** sintomi comuni causati dalla stenosi aortica.

Altre manifestazioni cliniche *rare* sono:

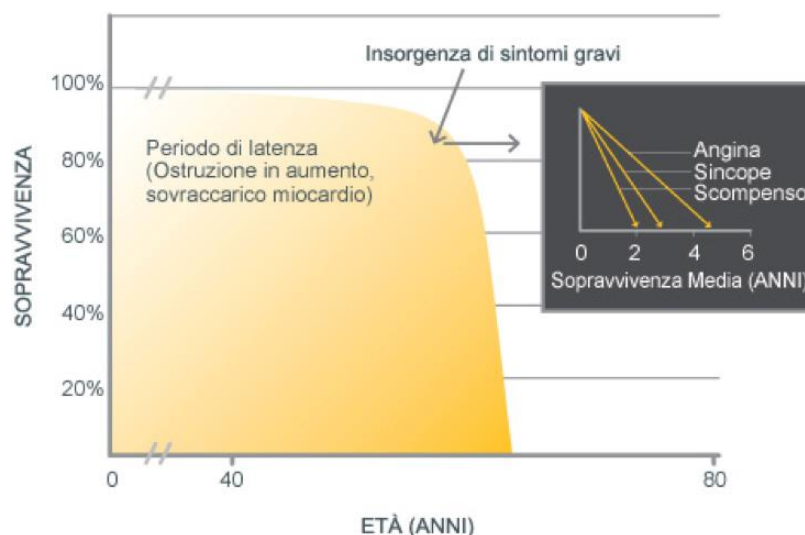
- le emorragie digestive spesso associate ad angiodisplasie, il sanguinamento è spesso causato da un difetto acquisito della struttura del fattore di von Willebrand;<sup>55</sup>
- emboli calcifici a vari organi, dovuti al distacco di frammenti calcifici dalla valvola aortica;
- aumentato rischio di endocardite infettiva, per il più facile attecchimento di popolazioni batteriche sulla valvola calcifica e deformata.

E' stato osservato come la prognosi per i pazienti sintomatici non sottoposti a sostituzione valvolare aortica sia grave e correlata con il tipo di sintomi.

L'inizio dei sintomi costituisce uno snodo cruciale nella storia naturale della malattia, provocando un repentino e drammatico peggioramento della prognosi.

Dalle curve di sopravvivenza elaborate da Ross si evidenzia l'importanza della sintomatologia. In assenza d'intervento chirurgico l'aspettativa media di vita è di circa 5 anni dall'insorgenza di angina pectoris, 3 anni dall'insorgenza di sincope e di 1-2 anni dopo un episodio di scompenso cardiaco congestizio.<sup>56</sup>





**Figura 11:** curva di Ross che descrive l'andamento temporale clinico e prognostico dei pazienti con stenosi valvolare aortica non sottoposti a trattamento.<sup>56</sup>

### 1.5.2 Esame obiettivo

I caratteri fondamentali dell'esame obiettivo nel paziente con SVA consistono nella palpazione dei polsi periferici, valutazione dei soffi sistolici e toni cardiaci e ricerca di segni di scompenso cardiaco.

Alla *palpazione* il polso arterioso periferico dei pazienti con stenosi emodinamicamente significativa è tardo, cioè caratterizzato da una lenta ascesa dell'onda pressoria, dovuta al rallentamento della fase di eiezione e diventa debole quando la pressione differenziale cade.

In presenza di ipertrofia ventricolare sinistra la palpazione rileva un itto della punta più energico e prolungato. Quando il cuore si dilata l'itto si sposta verso sinistra e in basso.

In regione parasternale alta o al giugulo è rilevabile un fremito che è la sensazione tattile corrispondente a un soffio di bassa frequenza.

L'*auscultazione* permette di rilevare numerosi segni che consentono di accertare la presenza e gravità della stenosi. Il segno più caratteristico è un soffio sistolico di bassa frequenza di tonalità aspra udibile sul focolaio aortico e al II spazio intercostale sinistro, irradiato sia verso i vasi del collo sia verso l'apice cardiaco.

Il soffio inizia dopo il I tono, cresce sino a raggiungere un massimo al culmine dell'eiezione, poi decresce e cessa prima del II tono. Il soffio segue quindi un andamento parallelo all'espulsione del sangue durante la sistole. L'andamento in crescendo e decrescendo, che

alla registrazione del soffio dà una configurazione a “diamante”, e l’interruzione prima del II tono sono caratteristici dei soffi espulsivi.

Il soffio a volte scompare in corrispondenza dello sterno e può essere riascoltato in apice, simulando il soffio sistolico dell’insufficienza mitralica (fenomeno di Gallavardin).

La sua intensità non è proporzionale al grado di stenosi, tanto che nelle fasi terminali della malattia, quando l’eiezione è molto ridotta per la grave ostruzione, può diventare assai debole e breve, viceversa può essere intenso anche quando la stenosi non è emodinamicamente significativa.

Nelle fasi iniziali della malattia e soprattutto nei casi congeniti, il soffio della stenosi aortica è preceduto da un click di eiezione. Si tratta di un rumore breve e secco prodotto dall’apertura della valvola rigida che segue a breve distanza il I tono. Con il progressivo aggravarsi della malattia il click scompare.

La componente aortica del II tono ( $A_2$ ) risulta spesso ridotta di intensità per la scarsa mobilità dei lembi, oppure fusa con la componente polmonare  $P_2$  per il prolungamento dell’eiezione sinistra causato dall’ostruzione. In alcuni casi il prolungamento della fase di espulsione sinistra può essere tale da far cadere  $A_2$  dopo  $P_2$ . In questo caso è udibile uno sdoppiamento paradossale del II tono; infatti lo sdoppiamento aumenta durante l’espirazione e si riduce o si annulla durante l’inspirazione. Un’altra causa di sdoppiamento paradossale del II tono nei pazienti con stenosi aortica è il blocco di branca sinistra. Questo disturbo di conduzione ritarda la contrazione del ventricolo sinistro spostando la chiusura della valvola aortica  $A_2$  successivamente a quella della polmonare  $P_2$ .

E’ possibile inoltre udire un tono aggiuntivo presistolico (IV tono) in corrispondenza della più energica contrazione atriale.<sup>25</sup>

## 1.6 DIAGNOSI STENOSI VALVOLARE AORTICA

### 1.6.1 Esami strumentali

L'*elettrocardiografia (ECG)* nella SVA severa mostra segni d'ipertrofia VS, valutabile mediante l'indice di Sokolow, associati o meno al sottoslivellamento del tratto ST e inversione dell'onda T segni di sovraccarico ventricolare sinistro.

Si osserva spesso un allungamento dell'onda P segno d'impegno atriale sinistro e/o ipertrofia e/o difetti di conduzione.

Possono essere presenti blocchi atrio-ventricolari o di branca dovuti all'estensione della calcificazione presente a livello valvolare nel tessuto di conduzione.

Deve essere tenuto in considerazione che un 15% dei pazienti con SVA severa non mostra segni elettrocardiografici d'ipertrofia ventricolare, quindi l'assenza d'ipertrofia non esclude la presenza di SVA severa.<sup>57</sup>

Alla *radiografia del torace* nella SVA si riscontra comunemente un'immagine cardiaca normale, una dilatazione in aorta ascende prossimale (dilatazione post-stenotica) e calcificazioni della valvola aortica riscontrabili nelle proiezioni laterali.

Il cuore di solito ha dimensioni normali o è leggermente ingrandito, il ventricolo sinistro presenta arrotondamenti del margine e dell'apice in presenza di ipertrofia concentrica e l'atrio sinistro può essere leggermente ingrandito nei pazienti con SVA severa.

Vi possono essere segni di congestione venosa e edema nei campi polmonari.

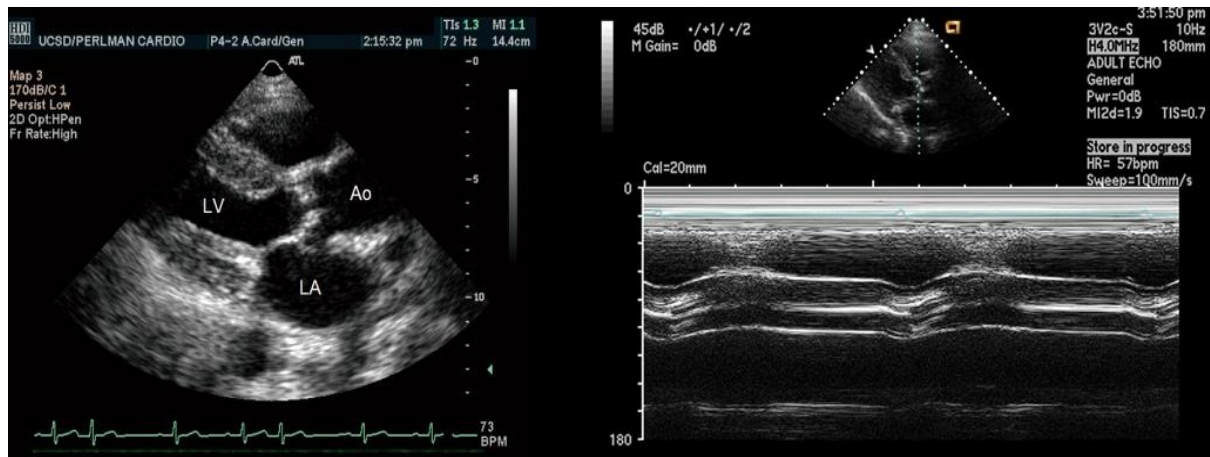
L'*ecocardiografia-doppler* è una metodica non invasiva molto utilizzata nella valutazione, follow-up e selezione dei pazienti con SVA severa candidati all'intervento chirurgico.

Le immagini ecocardiografiche mediante metodica M-mode o bidimensionale permettono un'accurata definizione dell'anatomia valvolare e severità della calcificazione.

La valvola calcifica appare come una struttura tricuspide, con marcato ispessimento alla base dei lembi e ridotta apertura valvolare in base alla gravità e durata della malattia.

L'ecocardiografia è utile inoltre per valutare spessore delle pareti, volume, massa e funzionalità sistolica del VS.

L'ipertrofia del VS determina ispessimento sia del setto interventricolare sia della parete posteriore del VS, tuttavia le dimensioni del VS rimangono nella norma.<sup>58</sup>



**Figura 12:** immagine ecografica di stenosi valvolare aortica valutata in modalità bidimensionale proiezione parasternale asse lungo ed in modalità M-mode.

L'eco-doppler è utile per valutazioni emodinamiche basate su indici flusso dipendenti come la velocità di picco istantaneo, il gradiente trans-valvolare e l'area valvolare aortica.

In particolare:

- la velocità di picco trans-valvolare aortico ( $V_{max}$ ) è ottenuta con metodica doppler ad onda continua;
- il gradiente pressorio trans-valvolare massimo ( $G_{max}$ ) è ricavabile dalla velocità di picco tramite l'equazione di Bernulli<sup>c</sup>, il gradiente pressorio trans-valvolare medio ( $G_{med}$ ) è ottenuto dalla differenza dell'integrale tempo/gradiente pressorio;
- l'Area Valvolare Aortica (AVA) è ricavabile mediante l'equazione di continuità<sup>d</sup>.<sup>59</sup>

<sup>c</sup> L'equazione di Bernulli afferma che:

$$P_1 - P_2 = 4(V_1^2 - V_2^2)$$

Con  $P_1 - P_2$  gradiente pressorio,  $V_1$  velocità all'orifizio e  $V_2$  velocità prossimale all'orifizio.

Se la velocità del sangue in sede prossimale alla stenosi è ridotta al di sotto 1 m/s può essere ignorata, quindi il gradiente pressorio a livello dell'orifizio discreto è pari a quattro volte il quadrato della velocità massima del flusso che attraversa la stenosi cioè  $P_1 - P_2 = 4V_1^2$ .

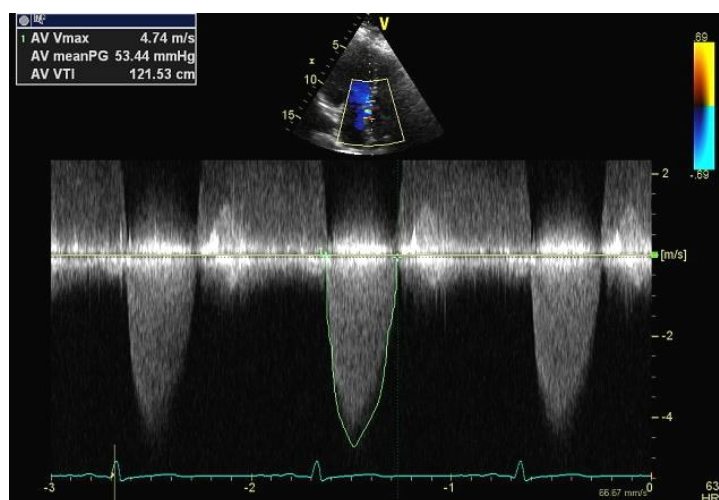
Perciò una volta ricavata la velocità massima del flusso trans-valvolare mediante metodica doppler continuo è facile ricavare il gradiente pressorio massimo.

<sup>d</sup> L'equazione di continuità afferma che:

$$A_1 V_1 = A_2 V_2$$

Ossia il prodotto di area trasversale e velocità è costante in un sistema di flusso chiuso. Pertanto nel caso della stenosi aortica, il prodotto di area e velocità nel tratto di efflusso del ventricolo sinistro è pari al prodotto di area e velocità a livello dell'orifizio valvolare aortico, perciò  $A_2 = A_1 V_1 / V_2$ . L'area del tratto di efflusso è ricavabile mediante calcoli volumetrici standard, mentre la velocità si ricava dal tracciato doppler pulsato (per il tratto di efflusso) e continuo (per l'orifizio valvolare), una volta ottenuti questi parametri è possibile ricavare il valore dell'area valvolare.

L'indicizzazione dell'area valvolare per la superficie corporea (AVAi) risulta appropriata nell'ottica di considerare pazienti più minuti con aree di per se ridotte, ma può non essere del tutto appropriata in pazienti obesi e sovrappeso.<sup>60</sup>



**Figura 13:** calcolo della Vmax e del Gmed mediante esame doppler continuo trans-aortico.

La *Tomografia Computerizzata (TC) multislice* è utilizzata per accertamenti delle calcificazioni valvolari e per valutare nel dettaglio la dilatazione aortica nei pazienti con patologia della radice aortica evidenziata in ecocardiografia. Misurazioni della dimensione aortica a un livello superiore in corrispondenza dei seni di Valsalva, giunzione aortica, aorta ascendente sono necessarie per decisioni cliniche e organizzazione dell'intervento.

La *Risonanza Magnetica (RM)* è utile nella valutazione del volume, massa e funzione del ventricolo sinistro, specialmente nei casi in cui queste informazioni non possono essere ottenute in ecocardiografia.

Inoltre, la RM è in grado di valutare la morfologia valvolare, la presenza d'ispessimenti, di misurare l'orifizio valvolare e l'entità della stenosi con buona concordanza rispetto alle altre tecniche strumentali; tuttavia la presenza di calcificazioni può determinare un'interferenza di segnale.<sup>61</sup>

### 1.6.2 Cateterismo cardiaco e angiografia

In quasi tutti i pazienti, l'esame ecocardiografico fornisce importanti informazioni emodinamiche per la gestione del paziente, perciò il cateterismo cardiaco è attualmente considerato quando le metodiche non invasive sono inconclusive, quando i dati clinici ed ecocardiografici sono discrepati e per la coronarografia prima dell'intervento chirurgico.

Le misurazioni delle pressioni in ventricolo sinistro e in aorta ascendente possono avvenire simultaneamente con un unico catetere con micro-manometro e con trasduttore prossimale e distale che permette di quantificare l'entità delle pressioni contemporaneamente.

Principalmente sono due i gradienti utilizzati nella pratica clinica per l'identificazione della severità della stenosi aortica:

- il gradiente picco-picco (*Peak to Peak Gradient*) che costituisce la differenza tra la pressione massima in aorta e la pressione massima in ventricolo sinistro;
- il gradiente medio (*Mean Gradient*) calcolato come l'integrale della differenza pressoria tra aorta e ventricolo sinistro durante la durata della sistole.

Il gradiente picco-picco può essere inferiore a quello di picco istantaneo misurato all'ecocardiografia, mentre il gradiente medio è ben correlato tra cateterismo e ultrasuoni.

La determinazione della gittata cardiaca per via invasiva può essere eseguita in vari modi. Una modalità accurata è rappresentata dalla tecnica di Flick: conoscendo il consumo di ossigeno nell'unità di tempo e la differenza artero-venosa di ossigeno è possibile ricavare la gittata cardiaca.

L'AVA è valutabile conoscendo la gittata cardiaca e il gradiente medio e applicando la formula di Gorlin.<sup>17</sup>

Data la sempre più consistente associazione con la coronaropatia aterosclerotica, in special modo nei pazienti anziani, una valutazione coronarografia può essere indicata.

Alcuni rischi sono associati alla rapida iniezione di un grande volume di mezzo di contrasto in un ventricolo sinistro ad alta pressione e quindi la ventricolografia sinistra in genere non è consigliabile nei pazienti con SVA critica. Gli studi angiografici del VS e della valvola aortica in questi pazienti sono eseguiti meglio iniettando il mezzo di contrasto nell'arteria polmonare e filmando nelle proiezioni obliqua anteriore destra a 30° e in quella obliqua anteriore sinistra a 60°.<sup>62</sup>

## 1.7 VALUTAZIONE NON INVASIVA DELLA FIBROSI CARDIACA

La biopsia endomiocardica è il gold-standard per la quantizzazione del contenuto di collagene miocardico. Tuttavia, le moderne tecniche d'imaging sono in grado di fornire indicazioni sensibili e specifiche di fibrosi.

La valutazione della fibrosi potrebbe essere eseguita mediante valutazione funzionale, di fatto la deposizione di collagene extracellulare comporta una perdita di riserva contrattile e un'accresciuta rigidità miocardica proporzionale al grado di fibrosi.

Idealmente le metodiche d'imaging possono essere suddivise in:

- metodiche di visualizzazione della fibrosi (Integrated Back-Scatter, IBS; Cardiac Magnetic Resonance Imaging, CMRI; Nuclear Medicine, NM);
- metodiche di valutazione della disfunzione sistole-diastolica sub-clinica (IBS; CMRI; ma soprattutto ecocardiografiche: Tissue Doppler Imaging, TDI; Speckle Tracking Imaging, 2D-STI).

Le metodiche disponibili possono identificare pazienti a rischio di disfunzione miocardica legata a fibrosi, permettendo una precoce introduzione alla terapia.

- L'*Integrated Back-Scatter (IBS)* attraverso la riflettività tissutale permette una caratterizzazione della deposizione di collagene. In aggiunta alle caratteristiche qualitative M-Mode e bidimensionali della cicatrice, come acinesia e iper-reflettività, le metodiche di back-scatter consentono mediante la video-densitometria ultrasonora e l'analisi della struttura di valutare la componente fibrosa. Il back-scatter ha dimostrato di correlare tanto con il contenuto di collagene quanto con la concentrazione incrementata di pro-collagene.<sup>63</sup>

- La *Cardiac Magnetic Resonance Imaging (CMRI)* è stata estesamente applicata per definire la cicatrice miocardica ed è la metodica non invasiva di riferimento per la quantificazione della fibrosi focale. Il fenomeno del delayed-enhancement<sup>e</sup> è in grado d'identificare regioni di fibrosi pari a 0,16 grammi di tessuto, come aree di segnale aumentato.

A differenza del contesto ischemico, in cui la fibrosi è sub-endocardica o trans-murale, in assenza di ischemia la distribuzione è irregolare finanche sub-epicardica.

---

<sup>e</sup> Delayed-enhancement: in immagini T1 acquisite, dopo 10-15 minuti dalla somministrazione del mezzo di contrasto si visualizzano le aree di fibrosi/necrosi miocardica.

La fibrosi è di frequente riscontro nell'ipertrofia ventricolare sinistra e il delayed-enhancement correla positivamente con il grado di rimodellamento e la pressione telediastolica.

La fibrosi intra-miocardica ha un pattern di distribuzione medio parietale (*mid-wall*) nel 38% dei pazienti con stenosi aortica moderata e si associa a un aumento di mortalità di quasi 8 volte.<sup>64 - 65</sup>

- Il *Tissue Doppler Imaging (TDI)* esprime il profilo di velocità di una regione miocardica d'interesse in sistole e in diastole rispetto al tempo. La riduzione delle velocità tissutale sistoliche, propria anche della senescenza, ha dimostrato di correlare con la fibrosi tissutale.<sup>66</sup>

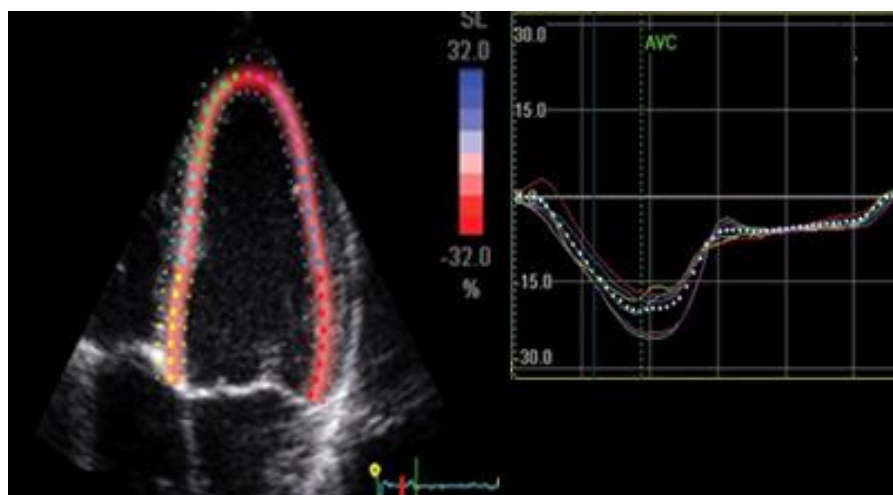
- Lo *Speckle Tracking Imaging (2D-STI)* rappresenta una nuova e non invasiva tecnica d'imaging che permette una valutazione globale e regionale della funzione miocardica. In particolare il miocardio nell'immagine ecocardiografica non appare uniforme, ma come un insieme di macchie distribuite casualmente nello spazio (*speckles*) e ciò conferisce un aspetto granulare e univoco a ogni regione di tessuto. La formazione degli speckles è dovuta all'interazione degli ultrasuoni con il tessuto miocardico e alla generazione di una riflessione diffusa in tutte le direzioni (*scattering*). In questo modo gli speckles rappresentano una sorta d'impronta digitale temporaneamente stabile all'interno di un'area campione (*kernel*) e perciò vengono seguiti (*tracking*) durante i cicli cardiaci (*frame by frame*) per derivare parametri quali strain e strain-rate, utili nel valutare la funzionalità ventricolare.

Il valore di strain è adimensionale ed è espresso in percentuale e indica l'ammontare totale della deformazione miocardica, lo strain rate è la derivata temporale dello strain e indica il tasso di deformazione istantaneo.

Lo strain longitudinale globale (*Global Longitudinal Strain, GLS*) rappresenta la percentuale di accorciamento miocardico media in sistole ed è espressa in percentuale negativa; il confronto con la risonanza magnetica ha mostrato una correlazione di questo parametro con il delayed-enhancement, con il numero di segmenti fibrotici e la fibrosi miocardica totale in pazienti con cardiomiopatia ipertrofica.

Rispetto alla metodica tissutale, la valutazione mediante Speckle Tracking consente di determinare questi parametri in ogni direzione lungo i piani di scansione.<sup>67 - 68</sup>





**Figura 14:** valutazione dello strain cardiaco mediante Speckle Tracking Imaging.

Lo sviluppo di queste metodiche d'imaging ecocardiografiche permette quindi l'introduzione d'indici più sensibili di funzione sistolica, in grado cioè di rilevare la presenza di disfunzione nonostante preservata FE.

Il 2D-STI consente una valutazione multidirezionale della deformazione miocardica e potrebbe dunque migliorare l'identificazione dei pazienti da candidare ad intervento di sostituzione valvolare aortica prima che le alterazioni tissutali risultino irreversibili (timing operatorio), con conseguente incremento delle chance di recupero post-operatorio e miglioramento clinico.

- Il dosaggio plasmatico di pro-collagene, tramite la misurazione dei pro-peptidi del pro-collagene rilasciati nel sangue, offre la possibilità di ottenere degli indicatori surrogati della sintesi di collagene. Il pro-peptide carbossi-terminale del pro-collagene tipo I (PIP) e l'amino-terminale del procollagene tipo III (PIIIP) sono utilizzati come marker di turnover interstiziale, in quanto le loro concentrazioni plasmatiche sono correlate al contenuto ed al turnover del collagene tissutale.

La matrice extracellulare miocardica contiene collagene tipo I e III, il processo di sintesi inizia con la deposizione da parte dei fibroblasti di pro-collagene I e III nella matrice extracellulare, successivamente queste macromolecole subiscono un processo di clivaggio da parte di proteasi a livello delle estremità amino e carbossi pro-peptidiche dando origine a fibrille collagene tipo I e III mature.

Infine, i frammenti pro-peptidici carbossi e amino-terminale (PIP, PIIIP) del pro-collagene I e III vengono rilasciati nel sangue e saranno dosabili nel plasma.<sup>69</sup>

## 1.8 microRNA E PATOLOGIA CARDIOVASCOLARE

### 1.8.1 Ruolo biologico dei microRNA

Sino a pochi anni fa la ricerca genica si è concentrata principalmente sull'individuazione di geni strutturali i cui prodotti codificassero per le proteine. Tuttavia, studi recenti indicano che un gran numero di geni non codificano proteine, ma i loro prodotti ricoprono importanti funzioni di regolazione. All'interno di questa classe, troviamo dei geni che producono piccole molecole di RNA, denominate microRNA (miRNA).

Non tutti gli RNA trascritti a partire dal DNA sono RNA messaggeri. Oltre agli RNA di trasporto e agli RNA ribosomiali vi sono anche RNA la cui funzione non riguarda direttamente l'espressione del codice genetico e perciò sono chiamati non coding RNA (ncRNA).

In base alle dimensioni, gli RNA non codificanti vengono suddivisi in due gruppi principali:

- small ncRNA (sncRNA) con lunghezza minore di 200 nucleotidi che includono i microRNA (miRNA) e gli small interference RNA (siRNA);
- long ncRNA (lncRNA) con lunghezza maggiore di 200 nucleotidi.

I miRNA svolgono il ruolo d'inibitori dell'espressione genica, questa funzione di silenziamento è conservata in tutte le specie viventi, dalle piante fino agli esseri umani, e perciò costituisce un meccanismo fondamentale di regolazione.

A causa della loro profonda influenza sull'espressione genica i miRNA stanno assumendo un'importanza centrale nella comprensione dei normali processi di sviluppo, come anche di condizioni fisiologiche e patologiche.

I dati attuali indicano l'esistenza nella specie umana di approssimativamente 1000 geni codificanti per i miRNA, valore che corrisponde a circa il 5% del genoma umano.<sup>70 - 71</sup>

La trascrizione di geni miRNA produce trascritti primari di RNA con struttura a forcina (*hairpin, stem-loop*) chiamati pri-miRNA.

I pri-miRNA sono processati in molecole più piccole a doppio filamento all'interno del nucleo ad opera di un enzima chiamato DROSHA, per formare un'altra struttura chiamata pre-miRNA.

A loro volta i pre-miRNA, con l'aiuto di specifiche proteine di trasporto, sono traslocati nel citoplasma e subiscono un ulteriore taglio ad opera di un enzima chiamato DICER per

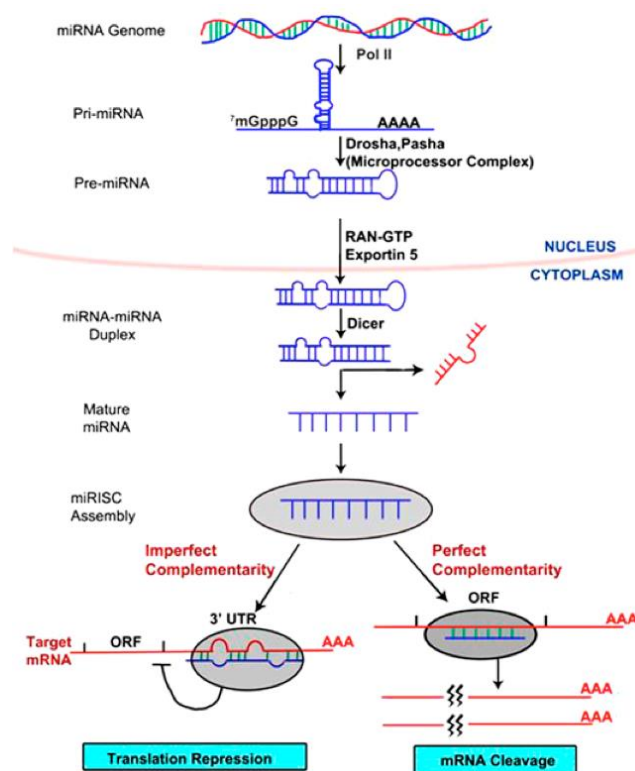
formare frammenti ancora più piccoli. Si generano così miRNA maturi con una lunghezza di 21-30 nucleotidi.

In questo stadio il miRNA è ancora a doppio filamento (dsRNA), contente sia il miRNA maturo che il suo complementare. Il dsRNA viene legato a dalle proteine Argonaute (Ago) e incorporato in un complesso multi-proteico chiamato complesso silenziatore indotto da RNA (*RNA-Induced Silencing Complex*, RISC). A questo punto uno dei due filamenti (filamento guida) rimane legato ad Ago e costituirà il microRNA maturo, mentre l'altro filamento (filamento passeggero) sarà sottoposto a degradazione da parte di un enzima con attività elicastica.

All'interno del complesso proteico RISC, il miRNA maturo è in grado di appaiarsi a sequenze complementari presenti nella regione 3'UTR di RNA messaggeri (mRNA) e di regolarne l'espressione genica. Per il corretto funzionamento della regolazione da parte dei miRNA risulta fondamentale la sequenza dei primi 6-8 nucleotidi all'estremità 5' (*seed sequence*) che si appaia complementariamente con il sito 3'UTR dell'mRNA bersaglio.

Il silenziamento può avvenire sia tramite degradazione del mRNA sia tramite blocco della traduzione. Se c'è sovrapposizione completa tra il miRNA e il messaggero bersaglio, il complesso RISC causa il clivaggio dell'mRNA.

Se invece non c'è una sovrapposizione completa, il silenziamento avviene tramite o blocco della traduzione o impedendo l'associazione del ribosoma con l'mRNA target.<sup>72 - 73</sup>



**Figura 15:** biogenesi e maturazione dei miRNA.<sup>74</sup>

I miRNA quindi esercitano una regolazione genica molto potente ma anche molto fine, sia singolarmente che in gruppo (rete di miRNA). Inoltre, dal momento che i geni codificanti per i miRNA sono molto meno numerosi di quelli codificanti per le proteine, ne consegue che un dato miRNA può silenziare molti geni bersaglio. Peculiarità dei miRNA è la capacità di entrare in circolo mediante microvescicole (esosomi) in forma estremamente stabile e possono pertanto essere quantificati attraverso prelievo plasmatico.<sup>75 - 76</sup>

### 1.8.2 Ruolo fisiopatologico dei microRNA

Recentemente è emerso il ruolo regulate dei miRNA tissutali e plasmatici nel contesto di numerose patologie cardiovascolari.

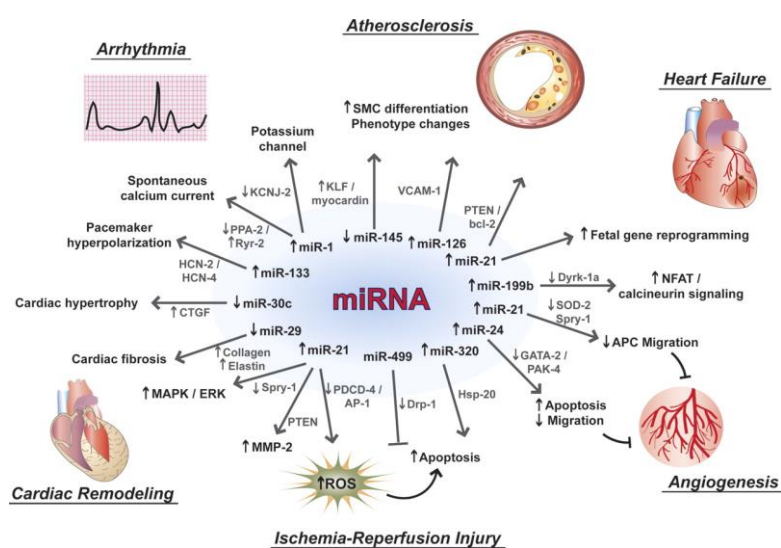
Poiché il pattern di espressione dei miRNA varia in base al tipo di patologia cardiaca, si ritiene che questi possano avere implicazioni eziologiche e patogenetiche e che il loro profilo di espressione possa essere usato come potenziale biomarcatore per la diagnosi, la prognosi e la risposta terapeutica.<sup>77</sup>

Il miRNA-21 in particolare ha dimostrato d'essere strettamente coinvolto nei processi di rimodellamento miocardico associati al sovraccarico emodinamico e nella fibrosi della matrice extracellulare. Studi hanno dimostrato il ruolo pro-fibrotico ritenuto da miRNA-21 e

il legame dei livelli tissutali e plasmatici del marcatore con il gradiente trans-valvolare medio in pazienti con stenosi aortica severa rispetto a ipertesi e soggetti normali.<sup>78 - 79</sup>

In un recente studio su International Journal of Cardiology di Derda e Thum et al. si cerca di differenziare sulla base del profilo d'espressione dei microRNA i quadri di cardiomiopatia ipertrofica ostruttiva, cardiomiopatia ipertrofica non ostruttiva e stenosi aortica. Lo studio conclude come diversi sono i miRNA coinvolti.<sup>80</sup>

Eric N. Olson, in uno studio recentemente pubblicato, rimarca il ruolo dei diversi miRNA nella patologia cardiovascolare. Alcuni regolano la proliferazione, l'ipertrofia e l'apoptosi dei cardiomiociti (miRNA-1, miRNA-21, miRNA-133, miRNA-199a/b), altri agiscono invece su fibroblasti e cellule infiammatorie per controllare rispettivamente la fibrosi (miRNA-17, miRNA-21, miRNA-29) e il processo infiammatorio (miRNA-155). La crescita e la stabilità dei vasi sanguigni così come l'angiogenesi e la proliferazione delle cellule muscolari lisce sono a loro volta controllati dall'attività dei miRNA su cellule dell'endotelio (miRNA-23, miRNA-24, miRNA-26, miRNA-27, miRNA-126) e cellule muscolari lisce (miRNA-21, miRNA-143, miRNA-145).<sup>81</sup>



**Figura 16:** ruolo dei miRNA nella fisiopatologia cardiaca.<sup>82</sup>

### 1.8.3 Ruolo dei microRNA nel processo fisiopatologico di fibrosi e ipertrofia cardiaca

Per quanto riguarda il rimodellamento cardiaco e la fibrosi miocardica, sono stati identificati diversi miRNA in grado di regolare questi fenomeni nei cuori sottoposti a sovraccarico pressorio.<sup>77</sup>

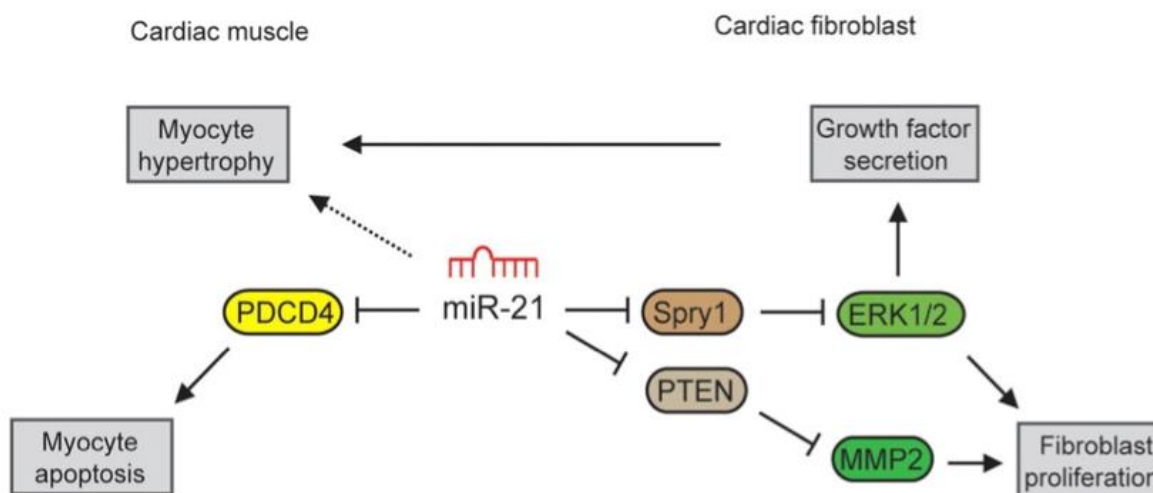
Il *miRNA-21* è sovra-regolato nei miocardiociti nel processo di fibrosi cardiaca, attraverso un meccanismo TGF- $\beta$  mediato. Il TGF- $\beta$  gioca un ruolo fondamentale nel rimodellamento ventricolare sinistro in risposta al sovraccarico emodinamico, sia in modelli di studio sperimentale che in pazienti con stenosi aortica.

È stato riscontrato che gli effettori del segnale TGF- $\beta$  regolano la trascrizione del precursore del *miRNA-21* e la sua maturazione post-trascrizione, inducendo la sovraespressione del complesso DROSHA. Il *miRNA-21*, una volta attivato, modula negativamente diversi fattori miocardici (*SPROUTY1*, *PTEN*, *PDCD4*) ed extra-cardiaci (*RECK* e *TIP3*) che giocano ruoli chiave nell'omeostasi della matrice extracellulare.<sup>78</sup>

Nel dettaglio il *miRNA-21* ha la capacità di modulare diversi target:

- inibisce la traduzione di *SPROUTY-1*, regolatore negativo della via ERK-MAPK, con l'effetto di attivare questa via di segnale e promuovere la proliferazione di fibroblasti e lo sviluppo di fibrosi;
- inibisce la traduzione di *PTEN*, regolatore negativo della via di segnale AKT, con l'effetto di attivare questa via di segnale e promuovere il processo di transizione epitelio-mesenchimale ed endotelio-mesenchimale per la produzione di miofibroblasti;
- inibisce la traduzione di *PDCD4*, con il risultato di promuovere l'effetto anti-apoptotico dei miocardiociti, la trans-differenziazione di fibroblasti in miofibroblasti e la ridotta espressione di metallo-proteinasi di matrice (Matrix Metallo-Proteinases, MMPs).
- a livello extra-cardiaco inibisce la traduzione di *RECK* e *TIP3*, con l'effetto di ridurre l'espressione di metalloproteinasi di matrice come MMP2 e MMP9.<sup>83 - 84 - 85</sup>

In uno studio Villar et al. hanno evidenziato il significativo ruolo dei *miRNA-21* nel rimodellamento miocardico in corso di stenosi aortica. I livelli miocardici e plasmatici di *miRNA-21* risultavano significativamente più alti nei pazienti con stenosi aortica rispetto ai controlli e correlavano direttamente con il gradiente trans-valvolare aortico, indice del grado di sovraccarico emodinamico del ventricolo sinistro, suggerendo un legame tra la severità della patologia e la sovra-espressione di *miRNA-21*. Si notava inoltre come anche l'espressione di collagene a livello miocardico potesse essere predetta dai livelli di *miRNA-21* miocardio e plasmatico.<sup>79</sup>



**Figura 17:** ruolo del miRNA-21 nella fibrosi cardiaca e suoi specifici bersagli molecolari.<sup>85</sup>

La famiglia del *miRNA-29* è sotto-regolata nei fibroblasti nel processo di fibrosi cardiaca. In risposta al sovraccarico pressorio il TGF- $\beta$  viene attivato e induce la sotto-regolazione del *miRNA-29*, il quale è un modulatore negativo di una serie di mRNA che codificano per proteine coinvolte nel processo di fibrosi come collagene, elastina e fibrillina.

In un recente studio Roncarati et al. hanno dimostrato che il *miRNA-29a* è sopra-regolato nel processo d'ipertrofia cardiaca. L'alta pressione intraventricolare causata dall'ostruzione valvolare aumenterebbe la trascrizione miocardica di *miR-29*; quindi si potrebbe sfruttare il *miRNA-29* come biomarcatore dell'espressione sia di fibrosi che d'ipertrofia.<sup>86</sup>

La famiglia del *miRNA-133* è sotto-regolata nei miocardiociti nel processo di fibrosi cardiaca. Il *miRNA-133* è un importante modulatore negativo per diverse proteine di matrice e fattori di crescita, come il Connective Tissue Growth Factor (CTGF) che svolge un ruolo chiave nella promozione di fibrosi.<sup>87</sup>

Duisters et al. hanno dimostrato in pazienti con ipertrofia ventricolare sinistra la correlazione tra la sotto-regolazione di *miRNA-133* e la sovra-regolazione di CTGF e gli effetti della loro interazione sulla sintesi di collagene.<sup>88</sup>

In studi recenti si evidenzia che il *miRNA-133* è sotto-regolato nei miocardiociti anche nel processo d'ipertrofia cardiaca: RhoA (una proteina di scambio GTP-GDP), CDC42 (una chinasi trasduttrice del segnale implicata nello sviluppo di ipertrofia) e WHSC2 (un fattore nucleare coinvolto nella cardiogenesi) sono stati identificati come possibili target modulati negativamente da *miRNA-133* per contrastare l'ipertrofia.<sup>89</sup>

Il *miRNA-1* è sotto-regolato nei miocardiociti nel processo d'ipertrofia cardiaca. Il *miRNA-1* con la sua attività modula negativamente la via dell'Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) sia direttamente inibendo l'espressione dello stesso IGF-1 e il suo recettore che indirettamente attraverso la down-regolazione di altri target legati a questa via. Nella biologia miocardica IGF-1 e la sua via di trasduzione del segnale sono coinvolti in una serie di processi inclusi sviluppo, ipertrofia, apoptosi, eccitazione e contrazione miocardica. Quindi il *miRNA-1* contrastando gli effetti di questa via di segnale è in grado di attenuare l'ipertrofia cardiaca.<sup>90</sup>

#### *1.8.4 lncRNA e patologia cardiovascolare*

I lncRNA sono trascritti lunghi più di 200 nucleotidi non codificanti per proteine. Tuttavia questa definizione potrebbe essere superata, in quanto recentemente è stato riportato come diversi lncRNA possano codificare per piccoli peptidi.

I lncRNA possono interagire con l'intera gamma di macro-vescicole presente nella cellula, incluse altre specie di RNA, proteine, e DNA. I siti complementari di lncRNA permettono loro di riconoscere e legare mRNA, microRNA, o anche altri lncRNA e agire come sensori altamente specifici per la loro stessa regolazione. Il sito di legame per le proteine permette loro di generare ribonucleo-proteine con diverse funzioni. Inoltre, attraverso lo switching conformazionale, i lncRNA possono essere attivati o soppressi mediante segnali esterni rendendosi fini meccanismi di regolazione.<sup>91</sup>

La possibilità di formare siti di legame e la capacità di andare incontro a cambiamenti conformazionali allosterici, è resa possibile dalla varietà di strutture conformazionali secondarie e terziarie assumibili dai lncRNA.

I lncRNA possono essere divisi in lncRNA nucleari e lncRNA citoplasmatici.

I primi guidano i modificatori della cromatina come gli istoni metil-transferasi e Polycomb Repressive Complex-2 (PRC-2) verso loci genici specifici, con il risultato di portare verso uno stato di repressione dell'eterocromatica, perciò down-regolazione della trascrizione. Al contrario, l'attivazione della trascrizione è stata riscontrata attraverso il reclutamento di un istone-metiltransferasi (Mixed Lineage Leukemia-1, MLL-1) e attraverso un'attività di enhancement data dal lncRNA stesso.<sup>92</sup>

I lncRNA citoplasmatici modulano l'espressione genica sia positivamente che negativamente. Contrastano la traduzione attraverso il legame con mRNA target o al contrario la favoriscono agendo come RNA competitivi sequestranti i miRNA.



Diversi studi hanno analizzato il ruolo dei lncRNA nella patogenesi cardiaca e hanno dimostrato che il profilo di espressione dei lncRNA a livello miocardico è alterato nello scompenso cardiaco e nell'ipertrofia ventricolare sinistra.

Recentemente il locus genico della catena pesante della miosina-7 è stato dimostrato dare origine a una serie di lncRNA che sono nominati trascritti associati alla catena pesante della miosina (Myosin Heavy chain associated RNA Trastiprs, MHRT).

*MHRT* è sotto-regolato nei miocardiociti nel processo d'ipertrofia cardiaca. *MHRT* antagonizza la funzione di BRG1, che è un fattore di rimodellamento della cromatina ATP-dipendente coinvolto nella sovra-regolazione di diversi geni necessari per lo sviluppo d'ipertrofia.<sup>93 - 94</sup>

#### *1.8.5 Ruolo diagnostico dei microRNA*

I miRNA oltre ad essere presenti nelle cellule e tessuti da cui provengono, vengono anche immessi in circolo attraverso microvescicole, perciò un notevole ammontare di miRNA extracellulare circola attraverso i fluidi corporei con alta stabilità. Dato che sono state osservate differenze nell'espressione dei miRNA tra i soggetti sani e i soggetti malati e il variare del pattern di espressione dei miRNA in base al tipo di patologia, si ritiene possibile sfruttarli come potenziali biomarcatori plasmatici.<sup>95</sup>

Rispetto ai biomarcatori attualmente in uso, sostanzialmente proteine, i miRNA presentano diversi vantaggi:

- risultano altamente stabili nei fluidi corporei, poiché protetti dal clivaggio delle nucleasi inserendosi all'interno di microvescicole o complessi proteici;
- le moderne tecnologie di sequenziamento consentono una rapida e accurata misurazione dei livelli plasmatici di miRNA e la loro identificazione non richiede lo sviluppo di nuove tecniche diagnostiche;
- grazie alle moderne tecniche di amplificazione genica (PCR) è possibile misurare livelli molto bassi di miRNA in volumi ridotti di fluidi corporei.<sup>96 - 97</sup>

In sostanza, la stabilità e la diversità dei miRNA, in combinazione con le tecniche a disposizione li rende dei nuovi e promettenti biomarcatori diagnostici.

Tuttavia, i miRNA presentano anche alcuni limiti: una bassa correlazione tra studi diversi sui miRNA da considerare specifici per specifiche patologie e l'assenza di protocolli di laboratorio standardizzati per l'estrazione, il dosaggio e la normalizzazione dell'analisi.<sup>98</sup>

## 1.9 TERAPIA MEDICA STENOSI VALVOLARE AORTICA

Non esistono al momento terapie mediche in grado di limitare la progressione della malattia nei pazienti con SVA. La farmacoterapia ha tuttavia un ruolo nella gestione delle frequenti comorbidità.

I Pazienti con SVA severa dovrebbero evitare sforzi eccessivi, restrizione che non riguarda però i soggetti con gradi minori di severità.

I pazienti dovrebbero essere valutati e trattati per i fattori di rischio cardiovascolari convenzionali e dovrebbero essere eseguite rivalutazioni ecocardiografiche annuali nei soggetti con SVA severa e ogni 2-3 anni nei casi moderati.<sup>99</sup>

Per quanto riguarda i diuretici, sebbene siano benefici in caso di accumulo di liquidi, dovrebbero essere usati con cautela per evitare l'ipovolemia che potrebbe ridurre la pressione telediastolica ventricolare sinistra, con conseguente bassa gittata cardiaca e ipotensione ortostatica.

Gli ACE-inibitori dovrebbero essere utilizzati attentamente, in quanto sono benefici nel trattamento dei pazienti sintomatici con disfunzione sistolica non candidati all'intervento ma potrebbero causare ipotensione, perciò dovrebbero essere iniziati a basse dosi e incrementati lentamente alla dose target.<sup>100</sup>

I  $\beta$ -bloccanti possono deprimere la funzionalità cardiaca e indurre scompenso cardiaco e devono quindi essere evitati.

La Fibrillazione Atriale (FA) o il flutter si verificano in circa il 10% dei pazienti, probabilmente a causa della dilatazione atriale sinistra frequente in questi pazienti. Quando insorge la FA a causa della perdita della contrazione atriale e del riempimento adeguato della camera ventricolare sinistra, potrebbe verificarsi la rapida riduzione della gittata sistolica con comparsa di angina e ipotensione. Perciò la FA dovrebbe essere trattata appropriatamente generalmente con cardioversione. L'insorgenza di FA in un paziente precedentemente asintomatico potrebbe essere considerata come un segno dell'incombente insorgenza della sintomatologia.<sup>101</sup>

## **1.10 TERAPIA CHIRURGICA STENOSI VALVOLARE AORTICA**

### *1.10.1 Indicazioni all'intervento*

Le linee guida dell'European Society of Cardiology attuali indicano che la sostituzione valvolare aortica chirurgica (Aortic Valve Replacement, AVR) costituisce il trattamento di riferimento per i pazienti sintomatici con SVA.<sup>102</sup>

In particolare l'intervento di sostituzione valvolare è indicato (classe I) per:

- pazienti con SVA severa e sintomatica per dispnea, sincope e angina;
- pazienti con SVA severa e disfunzione ventricolare sinistra, valutata come Frazione di Eiezione (FE minore del 50%);
- pazienti con SVA severa asintomatici che dovrebbero eseguire interventi di by-pass coronarico o altri interventi cardiocirurgici.<sup>103</sup>

Esistono tuttavia condizioni cliniche, come la presenza di comorbidità o l'età avanzata con elevato indice di fragilità, che incrementano esponenzialmente il rischio operatorio, al punto da controindicare l'intervento convenzionale nonostante chiare indicazioni terapeutiche.

Per tali tipologie di pazienti esiste da oltre 10 anni una valida alternativa: l'impianto trans-catetere di protesi valvolare aortica (Trans-catheter Aortic-Valve Implantation, TAVI) che consente di offrire un'opzione terapeutica anche a quei pazienti che fino a pochi anni fa rimanevano non trattati.<sup>104</sup>

Il ruolo chiave della TAVI nel trattamento della SVA è sottolineato dalla sua inclusione nelle linee guida per il trattamento delle valvulopatie dell' European Society of Cardiology.

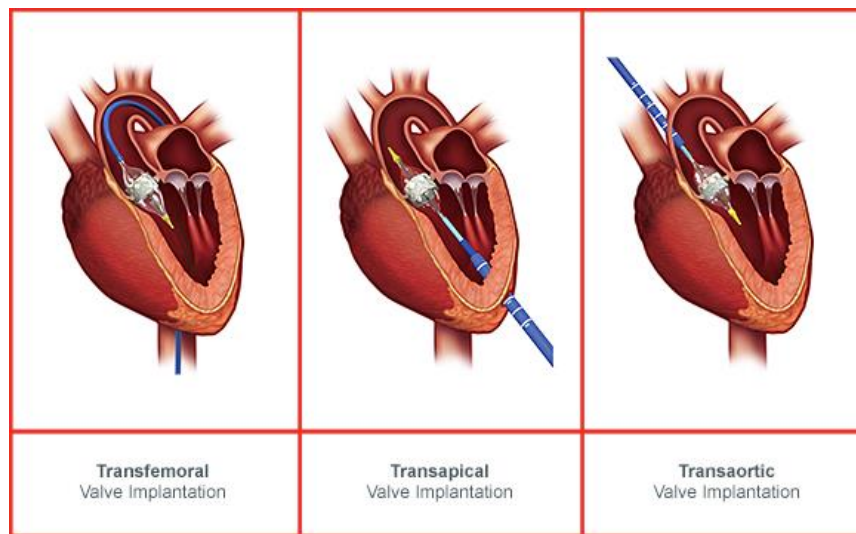
In particolare la TAVI è indicata (classe I) per:

- pazienti con SVA severa sintomatica che non possono essere sottoposti a chirurgia tradizionale (a giudizio di un team multidisciplinare, Heart Team) e con aspettativa di vita superiore ad 1 anno;
- pazienti candidabili a intervento tradizionale ma considerati a elevato rischio chirurgico.<sup>105</sup>

### *1.10.2 La tecnica TAVI*

La metodica consiste nell'impianto di una protesi biologica che viene introdotta attraverso un catetere e liberata in posizione aortica. La protesi aderisce saldamente alle pareti della radice aortica dislocando lateralmente i lembi della valvola aortica nativa patologica, che viene quindi funzionalmente sostituita dalla protesi.

La procedura può essere realizzata utilizzando diversi approcci: trans-femorale, trans-apicale, trans-succlavia, trans-aortico.



**Figura 18:** approcci utilizzati nella procedura TAVI.

L'approccio *trans-femorale* è quello di prima scelta e viene di norma utilizzato nei pazienti che non presentano controindicazioni nell'anatomia delle arterie ilio-femorali; si attua in modo percutaneo e solitamente evitando il ricorso all'anestesia generale. La protesi avanza in modo retrogrado lungo la via arteriosa all'interno di un sistema di rilascio e viene posizionata e liberata a livello della valvola aortica degenerata. In seguito il sistema di rilascio viene ritirato e l'arteria di accesso viene suturata in modo percutaneo.<sup>106</sup>

La via *trans-apicale* viene utilizzata quando la situazione anatomica non permette l'avanzamento della valvola protesica lungo l'arteria femorale. In questo caso si accede direttamente al ventricolo sinistro praticando una mini-toracotomia sinistra. Raggiunto l'apice del ventricolo sinistro, viene praticato un accesso chirurgico e posizionato un introduttore per consentire il passaggio della protesi. Attraverso il ventricolo sinistro, la protesi raggiunge la valvola stenotica e qui viene posizionata e liberata; in seguito il sistema d'introduzione e la guida vengono ritirati e viene suturato il foro all'apice del ventricolo sinistro. I potenziali vantaggi di questo approccio comprendono la possibilità di un accesso diretto alla valvola aortica ed un minor rischio di danni ai vasi periferici, evitando l'utilizzo di un catetere di calibro elevato attraverso il sistema ileo-femorale, l'arco aortico, l'aorta ascendente e la stessa valvola. I principali svantaggi sono rappresentati dalla necessità di eseguire una toracotomia, dalla possibilità di un danno diretto a carico del miocardio, dal rischio di sanguinamenti pericolosi associati alla sutura dell'apice cardiaco, dal danno a

carico della valvola mitralica e dalla possibilità d'insorgenza d'instabilità emodinamica.<sup>107</sup>

Anche l'approccio *trans-succlavia* è stato proposto come alternativa all'approccio trans-femorale. In questo caso è necessaria un'incisione chirurgica per isolare l'arteria succlavia (solitamente il vaso sinistro) e il vantaggio è rappresentato dalla minima distanza tra il punto di accesso del sistema protesico e la sede dell'impianto, che consente un posizionamento più controllato. Tuttavia, in caso di danni a carico della succlavia potrebbero verificarsi sanguinamenti intratoracici che sarebbero difficili da controllare.<sup>108 - 109</sup>

Meno frequentemente è effettuata la procedura per via *trans-aortica*, la quale necessita di una mini-sternotomia destra o centrale in anestesia generale e di un'aortotomia per raggiungere direttamente l'aorta ascendente. Sebbene sia una procedura molto invasiva, con questo accesso si evita il passaggio di cateteri di grosso calibro all'interno del sistema ilio-femorale e dell'arco aortico e non viene perforato l'apice ventricolare, riducendo il rischio di danno miocardico e di sanguinamenti.

Nella maggior parte dei centri di riferimento per le TAVI, la procedura con accesso trans-femorale viene svolta in un laboratorio di emodinamica e l'accesso trans-apicale in sala operatoria, poiché il paziente viene solitamente sottoposto ad anestesia generale e vista la necessità di un fluoroscopio di elevata qualità.

Indipendentemente dal tipo di protesi e dalla modalità di accesso, si esegue usualmente una valvuloplastica aortica preliminare con palloncino per agevolare il passaggio della protesi attraverso la valvola nativa stenotica.<sup>110</sup>

I modelli disponibili sono: Corevalve, Sapien, Lotus, Symetis, Portico, Direct flow Medical. Quelli principalmente utilizzati sono:

- Il *CoreValve System (Medtronic)* caratterizzato dall'auto-espansibilità è costituito da tre lembi valvolari di pericardio suino, montati su un telaio di nitinol auto-espansibile.

Attualmente è utilizzata la terza generazione del sistema CoreValve e sono disponibili tre dimensioni: 26 mm, 29 mm e 31 mm e la valvola viene impiantata utilizzando una guaina e un catetere 14 French per il rilascio. Questo dispositivo è impiantabile per via retrograda trans-femorale, trans-ascellare e trans-aortica.

- La *valvola Edwards Sapien XT (Edwards Lifescience Corporation, USA)* è costituita da tre lembi di tessuto pericardico bovino, montati su un telaio di cromo cobalto espansibile con palloncino. Si può impiantare per via retrograda (accesso trans-femorale e trans-aortico) o per

via anterograda (accesso trans-apicale). Anche per questa valvola l'attuale in utilizzo è di terza generazione, con dimensioni ridotte rispetto alle generazioni precedenti, tre le disponibili: 20 mm, 23 mm, 26 mm e 29 mm e il catetere per il rilascio può avere dimensioni di 16, 18, 19, 20 o 22 French, in base alle dimensioni della valvola.



**Figura 19:** nella prima immagine valvola Edward Sapien, nella seconda CoreValve.

L'utilizzo di nuove valvole e di dispositivi di rilascio di dimensioni ridotte ha consentito l'accesso per via trans-femorale a una porzione maggiore di pazienti e ridotto alcuni tipi di complicanze quali rischio di migrazione della valvola protesica, non ottimale posizionamento, ostruzione dell'ostio coronarico o disturbi della conduzione.

Ad esempio con la valvola Sapien 3 è sufficiente un introduttore con diametro interno di 14 French; le protesi Direct Flow, Lotus e la nuova versione di CoreValve "Evolute R" 44 presentano tutte la possibilità di essere riposizionate e completamente rimuovibili sino all'impianto definitivo; inoltre con le nuove valvole Sapien, la valvola Direct Flow e la Lotus l'incidenza di insufficienza aortica perivalvolare è diminuita in maniera significativa, con percentuali inferiori al 10% per quanto riguarda l'insufficienza di grado moderato o severo.

### *1.10.3 La selezione dei pazienti da sottoporre a TAVI*

Un'accurata selezione dei pazienti da sottoporre alla metodica rappresenta sicuramente una condizione fondamentale per incrementare le possibilità di successo della procedura. La valutazione pre-procedurale dovrebbe essere attuata da un'equipe multidisciplinare composta da: cardiocirurghi, cardiologi, anestesisti, cardiologi interventisti, specialisti in diagnostica per immagini.<sup>111 - 112</sup>

La scelta di procedere con una sostituzione valvolare mediante intervento tradizionale o per via trans-catetere si basa su molti fattori, tra cui il rischio operatorio e la presenza di comorbidità.

In fase pre-operatoria, l'equipe stabilirà anche le modalità di esecuzione dell'impianto e la gestione post-operatoria del paziente. L'acquisizione di un'adeguata raccolta d'informazioni relative all'anatomia è di fondamentale importanza: ecocardiografia transtoracica, TC multistrato e angiografia sono sempre utilizzate, ulteriori indagini possono essere effettuate mediante ecocardiografia trans-esofagea e risonanza magnetica.

Le dimensioni dell'anulus aortico, la presenza e il grado della stenosi e le caratteristiche morfometriche della valvola degenerata sono studiati solitamente con ecocardiografia transtoracica, trans-esofagea, angio-TC o combinando le metodiche. Un'accurata misurazione dell'anulus aortico è di fondamentale importanza per la scelta della valvola protesica, la cui misura viene scelta facendo sistematicamente una sovrastima di alcuni millimetri rispetto al diametro dell'anulus. Lo stato delle arterie ilo-femorali viene studiato con angio-TC o angiografia per verificare il diametro del vaso e la presenza di calcificazioni o tortuosità che possano impedire l'accesso per via trans-femorale. Lo studio delle coronarie e delle arterie periferiche permette di valutare la presenza di aterosclerosi e d'identificare quindi la via d'accesso ottimale per evitare possibili complicanze peri-operatorie.

La valutazione del profilo di rischio del paziente può avvenire mediante score sviluppati sulla base delle esperienze cardiocirurgiche degli ultimi 20 anni. I principali algoritmi che hanno guidato l'arruolamento dei pazienti nei maggiori studi sulle TAVI sono rappresentati dal Logistic Euroscore, l'Euroscore II e l'STS score.

Le Linee Guida 2014 per il trattamento delle valvulopatie cardiache indicano come candidabili alla sostituzione per via trans-catetere, pazienti con punteggio STS compreso tra l'8-15%. Tuttavia, in assenza di scale di rischio specifiche, per la TAVI è necessario prendere in considerazione molte condizioni che possono rappresentare controindicazioni all'esecuzione della metodica; tra queste: esiti di radioterapia al torace, aorta ascendente a porcellana o con severe calcificazioni, precedenti interventi chirurgici al torace con esiti aderenziali, severa disfunzione a carico del ventricolo sinistro, anulus aortico di dimensioni inferiori ai 18 mm o superiori ai 27 mm, presenza di vegetazioni o trombi intracardiaci, severa ipertensione polmonare.<sup>113 - 114</sup>

Risulta importante lo studio delle arterie coronarie mediante coronarografia, poiché una coronaropatia in forma severa si riscontra nel 40-75% dei pazienti in fase di valutazione per

TAVI; essa non rappresenta una controindicazione all'esecuzione della procedura, a meno che non sia molto severa e comprometta ampie aree miocardiche.

In questi casi è possibile eseguire un intervento di angioplastica coronarica; la rivascolarizzazione eseguita prima dell'impianto valvolare permette un migliore accesso ai vasi coronarici e un rischio più basso di eventi ischemici e d'instabilità emodinamica durante la fase di pacing e di gonfiaggio del palloncino.<sup>115</sup>

#### *1.10.4 Nuovi scenari*

Negli ultimi anni si è aperto un dibattito di grande interesse che riguarda l'offerta della TAVI anche a pazienti a rischio intermedio-basso.<sup>116</sup>

Lo studio osservazionale prospettico multicentrico OBSERVANT 40 (International Journal of Cardiology 2013) ha paragonato gli outcome a 30 giorni di un sottogruppo di 266 pazienti a rischio intermedio-basso (133 sottoposti a AVR rispetto a 133 pazienti sottoposti a TAVI, con protesi CoreValve e Edwards Sapien XT).

In questa popolazione la mortalità a 30 giorni, l'incidenza di stroke e d'infarto miocardico erano paragonabili dopo entrambe le procedure. I due approcci differivano in termini di necessità di trasfusioni d'emazie, superiore per l'AVR, e per incidenza di complicanze vascolari e impianti di pace-maker, maggiori dopo TAVI. Inoltre, l'incidenza di leak periprotetici sia di grado lieve che moderato, risultava più elevata dopo TAVI.<sup>117</sup>

Lo studio osservazionale prospettico SURTAVI 41 (JACC: Cardiovascular Interventions 2013), ha paragonato la mortalità a un mese e a un anno di 510 pazienti a rischio intermedio consecutivamente arruolati tra il 2006 e il 2010 (255 pazienti trattati con AVR e 255 pazienti sottoposti a TAVI, con il solo modello CoreValve). In questo studio gli autori dimostravano che a 30 giorni e ad un anno la mortalità per tutte le cause non differiva per i due trattamenti.<sup>118</sup>

Sono stati recentemente presentati i dati del trial PARTNER 2 (Placement of Aortic Transcatheter Valves) sulla TAVI in rapporto all'intervento di sostituzione valvolare nei pazienti con rischio cardiovascolare intermedio a un follow-up medio di 2 anni.

L'endpoint primario era la mortalità per tutte le cause o ictus invalidante a 2 anni.

Sono stati arruolati 2032 pazienti (1011 sottoposti a TAVI con device balloon-expandable Sapien XT valve vs 1021 pazienti trattati con chirurgia tradizionale), età media 81 anni, con rischio cardiovascolare intermedio. A 2 anni non è emersa nessuna differenza statisticamente



significativa in termini di endpoint primario tra i 2 gruppi; pertanto la TAVI risultava non inferiore rispetto alla chirurgia.

Tra i pazienti sottoposti a TAVI con approccio trans-femorale, l'incidenza combinata di morte e ictus invalidante era inferiore rispetto alla chirurgia, mentre nella coorte con approccio trans-toracico i risultati erano simili tra i 2 gruppi.

A 30 giorni, le complicanze vascolari maggiori come anche la frequenza e la severità del rigurgito perivalvolare era maggiore dopo TAVI rispetto alla chirurgia; tuttavia altre complicanze sono meno frequenti nel gruppo TAVI rispetto alla chirurgia, inclusi i sanguinamenti maggiori, l'insufficienza renale e l'insorgenza di FA di nuovo riscontro. Pertanto nei pazienti con SVA severa sintomatica, le due strategie di trattamento risultavano simili nel ridurre la mortalità e il rischio di stroke e si associavano anche a una riduzione simile dei sintomi cardiaci.<sup>119</sup>

## 1.11 CLASSIFICAZIONE FLUSSO-GRADIENTE STENOSI VALVOLARE AORTICA

### *1.11.1 Inadeguatezza dei parametri attuali per la valutazione di severità e indicazione all'intervento chirurgico*

La diagnosi di SVA severa è classicamente confermata tramite parametri ecocardiografici, che consistono in un orifizio valvolare aortico minore di  $1 \text{ cm}^2$  o minore di  $0,6 \text{ cm}^2/\text{m}^2$  se indicizzato per la superficie corporea, un gradiente trans-valvolare medio maggiore di 40 mmHg e una velocità di picco maggiore di 4 cm/s. Tuttavia, nella pratica clinica le discordanze tra questi tre parametri sono frequentemente osservate e in particolare tra il gradiente medio e l'area dell'orifizio valvolare. Tali discordanze sono facili da comprendere nei pazienti con ridotta FE e funzione sistolica compromessa, a causa della dipendenza del gradiente dal flusso; tuttavia possono comparire anche nei pazienti con FE preservata, portando a grande incertezza riguardo la severità della stenosi aortica.

Dato che le linee guida correnti raccomandano l'intervento chirurgico per i pazienti sintomatici o con FE ridotta, solo qualora la severità sia stata confermata, questa situazione potrebbe comportare una sottostima della stenosi in una parte dei pazienti e un inappropriato ritardo all'intervento di sostituzione valvolare con conseguente impatto prognostico negativo.<sup>120</sup>

Nel 2007 Pibarot e Dumesnil et al. pubblicarono per la prima volta la nuova entità patologica di SVA paradossa con basso-flusso basso-gradiente (Paradoxical Low-Flow Low-Gradient, PLFLG), rendendo la questione ancora più controversa. Nel loro articolo viene riportata una classe di pazienti con SVA severa cioè AVA minore di  $1 \text{ cm}^2$ , basso gradiente pressorio minore di 40 mmHg e bassa gittata sistolica, ma preservata FE ventricolare sinistra. Il termine paradosso si riferisce all'intuitiva contraddizione tra normale FE e bassa gittata sistolica.<sup>121</sup>

La necessità di approfondire queste incongruenze si è resa ulteriormente necessaria nel momento in cui Miner et al. nel 2010 evidenziarono che la discordanza dei parametri non era un prerequisito esclusivo dei pazienti PLFLG. Nel loro studio riportano una serie di pazienti con AVA ridotta e preservata funzione ventricolare sinistra e dai risultati emerse che il 30% aveva un AVA minore di  $1 \text{ cm}^2$  ma un gradiente medio minore di 40 mmHg, a prescindere dal basso o alto flusso. Conclusero quindi che questo problema era dovuto principalmente all'inadeguatezza dei parametri correnti utilizzati per valutare la severità della SVA.<sup>122</sup>

Questo e altri studi considerano vari fattori a supporto dell'inadeguatezza dei parametri di severità e indicazione all'intervento chirurgico attualmente in uso:

- Un parametro da rivedere sembra essere il cut-off dell'area dell'orifizio valvolare aortico; per la legge di Gorlin in presenza di una normale gittata sistolica, un AVA di  $1 \text{ cm}^2$  sviluppa un gradiente medio di 26 mmHg e per raggiungere i 40 mmHg supposti è necessaria un AVA minore di  $0.81 \text{ cm}^2$ . Sulla base di queste valutazioni Jander propose di abbassare il cut-off per la severità della SVA a  $0.8 \text{ cm}^2$  per rendere più appropriati i criteri pressori. Altri studi valutarono che indicizzando l'AVA per la superficie corporea e applicando i cut-off attuali di  $0.6 \text{ cm}^2/\text{m}^2$  e pressione media maggiore di 40 mmHg, la percentuale dei pazienti con discrepanza tra flusso e area valvolare aumentava ulteriormente.<sup>123</sup>

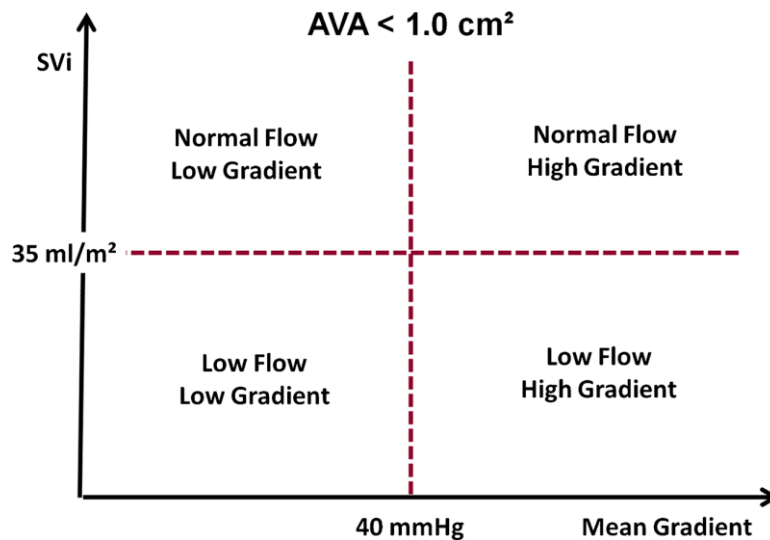
- Altro problema è l'accertamento dello stato di sintomaticità, pratica complessa nel paziente anziano con comorbidità. Nella gestione dei pazienti con SVA ritenuta severa, i sintomi attribuiti alla stenosi aortica (sincope, angina e dispnea) determinano quali pazienti dovrebbero essere indirizzati verso l'intervento di sostituzione valvolare. Nei pazienti sintomatici con comorbidità, come bronco-pneumopatie croniche ostruttive, obesità o ipertensione, la decisione terapeutica potrebbe essere particolarmente difficile per la non specificità dei sintomi. Inoltre, anche i pazienti asintomatici con SVA severa potrebbero beneficiare di un trattamento chirurgico in caso di pronunciate calcificazioni o rapida progressione.<sup>124</sup>

- Altra considerazione riguarda la FE, in quanto anche questo parametro è determinante per considerare o meno la necessità dell'intervento chirurgico nei pazienti con SVA severa. Le linee guida usano come cut-off per la FE il valore del 50% che è ben al di sotto di 2 deviazioni standard rispetto al valore della popolazione sana; ma soprattutto è importante considerare che per la valutazione della funzionalità sistolica ventricolare, la FE non si presta come parametro particolarmente sensibile nel momento in cui dovesse verificarsi un rimodellamento della cavità ventricolare (a differenza di altri parametri come il GLS che sembrano più appropriati). Perciò, c'è la possibilità che in diversi pazienti un'iniziale disfunzione ventricolare sinistra potrebbe essere classificata come normale.<sup>125 - 126</sup>

### *1.11.2 Classificazione alternativa flusso-gradiente*

Le considerazioni fatte in questi studi gettarono le basi per la rivalutazione della classificazione di SVA severa. Già nel 2009 Dumesnil e Pibarot et al. proposero una nuova classificazione per meglio valutare dal punto di vista diagnostico e terapeutico i pazienti con SVA severa. In questo studio 512 pazienti con SVA severa (AVAi minore di  $0,6 \text{ cm}^2/\text{m}^2$ ) e preservata FE vennero suddivisi in quattro gruppi sulla base di: normale o basso flusso valutato come gittata sistolica indicizzata (Stroke Volume index, SVi) maggiore o minore di 35 ml/min; alto o basso gradiente valutato come gradiente pressorio medio (Gmed) maggiore o minore di 40 mmHg. Quindi si delinearono 4 classi di pazienti: normal-flow low-gradient (NFLG), normal-flow high-gradient (NFHG), low-flow high-gradient (LFHG) e low-flow low-gradient (LFLG). È interessante notare che anche in questo studio solo il 38% dei pazienti aveva parametri che rientravano pienamente nei criteri proposti dalle linee guida per quanto riguarda il rapporto tra AVAi e gradiente medio (cioè i gruppi NFHG e LFHG), mentre il 62% aveva un gradiente più basso del previsto rispetto all'area valvolare (cioè i gruppi NFLG e LFLG). Inoltre, vennero notate delle differenze prognostiche tra i vari gruppi di pazienti in funzione del trattamento ricevuto, medico o chirurgico.<sup>127</sup>

In studi recenti, come quello condotto da Eleid et al. nel 2015, viene validata l'importanza di considerare sistematicamente entrambi i parametri di flusso e gradiente pressorio per la valutazione dei rischi e la gestione terapeutica dei pazienti con SVA. Il gradiente infatti è direttamente correlato con la severità della stenosi ma è inversamente proporzionale al flusso, di conseguenza un basso gradiente può essere marcatore di una stenosi meno severa e/o di uno stato di basso flusso, e come risultato finale il gradiente considerato singolarmente può sottostimare la severità della stenosi. Perciò i pazienti con stenosi aortica severa dovrebbero essere sempre classificati dicotomicamente per entrambi i parametri.<sup>128 - 129</sup>



**Figura 20:** classificazione flusso-gradiente stenosi aortica severa.<sup>130</sup>

Nel 2012 Lancellotti et al. approfondirono la questione per meglio caratterizzare l'outcome delle diverse classi di pazienti. Nello studio vennero valutati 150 pazienti con SVA severa (AVA minore di 1 cm²) asintomatica e preservata FE; seguendo la classificazione proposta da Dumesnil e Pibarot, i pazienti vennero suddivisi in base al gradiente e al flusso, inoltre vennero misurati i livelli di peptide natriuretico atriale (BNP).

Dall'analisi delle 4 classi si evince che:

#### *NFLG*

Questa classe è osservata nel 31-38% dei pazienti e sembra identificare un gruppo di pazienti con un grado meno severo di SVA; ciò può essere dovuta all'inappropriatezza delle linee guida che classificano come severa una stenosi aortica in realtà moderata o ad una esposizione alla patologia da un breve periodo di tempo. In effetti il volume atriale sinistro indicizzato (Left Atrium Volume index, LAi), un marker che riflette la cronicità del sovraccarico diastolico, è più basso rispetto alle altre classi. Questa entità è caratterizzata da una preservata funzione longitudinale ventricolare sinistra e bassi livelli di BNP. La prognosi di questi pazienti sembra relativamente preservata rispetto alle altre categorie.

#### *NFHG*

Questa classe rappresenta l'entità più frequente 39%-72% dei pazienti e i parametri sono pienamente in accordo con i criteri proposti dalle linee guida. Se comparata con il gruppo NFLG, sebbene la funzione longitudinale del ventricolo sinistro sia preservata, i livelli di BNP sono più alti. Il tempo di sopravvivenza libero da eventi cardiovascolari avversi è

ridotto e inoltre i pazienti con NFHG sembrano avere un grado più severo di SVA. Queste condizioni suggeriscono un'esposizione da più lungo tempo alla malattia.

### *LFHG*

Questa classe rappresenta l'8% dei pazienti con SVA severa. È caratterizzata da una SVi minore di 35 ml/m in presenza di una preservata FE ventricolare. Come precedentemente detto la FE è una stima inadeguata della funzionalità sistolica ventricolare sinistra. La FE infatti è influenzata sia dalla funzione miocardica che dalla cavità geometrica ventricolare.

La FE del ventricolo sinistro può perciò marcatamente sottostimare il grado del danneggiamento miocardico in presenza di un rimodellamento concentrico ventricolare sinistro, cosa che accade frequentemente nei pazienti con SVA. Quindi ciò che è valido per un ventricolo sinistro con una geometria normale può essere non valido per un ventricolo sinistro con rimodellamento concentrico.

In effetti in questa classe la riduzione della funzione longitudinale del ventricolo sinistro e gli alti livelli di BNP suggeriscono che il flusso ridotto sia conseguenza di una disfunzione miocardica intrinseca non rilevata dalla FE. Inoltre, il rischio di eventi cardiovascolari avversi è incrementato e la prognosi pressoché identica a quella dei pazienti con NFHG.

### *LFLG*

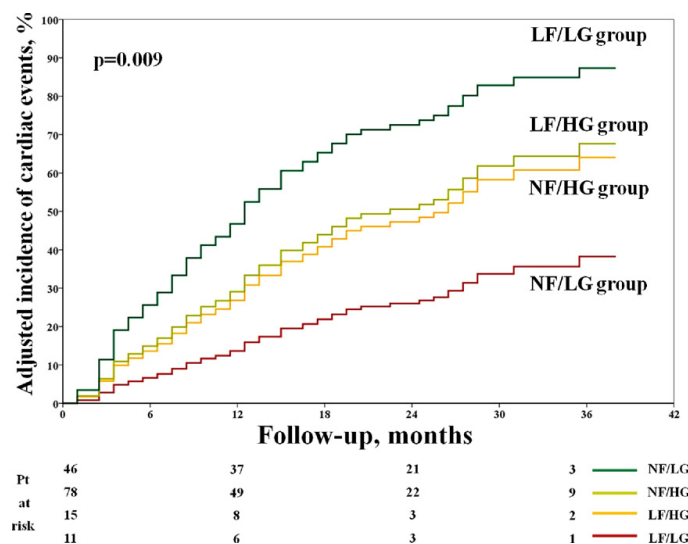
Questa classe rappresenta la tanto discussa SVA Paradoxical Low-Flow Low-Gradient. La prevalenza della classe LFLG sembra essere del 7% nei pazienti asintomatici e del 15-35% nei pazienti sintomatici. È associata a un rimodellamento concentrico ventricolare sinistro particolarmente pronunciato, cavità ventricolare sinistra più piccola, incremento globale del precarico ventricolare sinistro, disfunzione miocardica intrinseca, fibrosi miocardica e diversi studi dimostrano una prognosi peggiore.

Da quanto detto i pazienti LFLG hanno una serie di reperti che suggeriscono la presenza di uno stadio più avanzato della patologia; in effetti rispetto ai pazienti con normale flusso hanno una funzionalità longitudinale del ventricolo sinistro maggiormente compromessa e più alti livelli di BNP. Tuttavia, i livelli di BNP risultano lievemente inferiori rispetto alle classi LFHG e NFHG. La riduzione relativa del BNP è stata supposta essere correlata ad un esaurimento della produzione per la lunga durata della malattia, ad una più alta clearance o al diminuito rilascio per il ridotto stress di parete ventricolare sinistro rispetto al gruppo LFHG.

Da quanto riportato nello studio di Lancellotti questa classe di pazienti ha un rischio di eventi cardiovascolari avversi 4 volte superiore rispetto alla classe NFHG e la peggior prognosi

rispetto alle altre classi.

Questa entità clinica è spesso mal diagnosticata, ciò potrebbe portare a una sottostima della gravità della SVA e incorrere nell'errore di decisioni terapeutiche inappropriate.<sup>131</sup>



**Figura 21:** incidenza di eventi cardiovascolari avversi nelle 4 classi di pazienti.<sup>131</sup>

Tuttavia, la storia patogenetica di questa classe rimane ancora controversa e dibattuta nella letteratura attuale.

Nello studio di Pibarot e Dusmenil del 2007 in cui questa categoria è stata descritta per la prima volta, Hachicha et al. riportarono che i pazienti LFLG potevano avere una SVA severa con prognosi infausta se trattati con terapia medica invece che chirurgica. Anche altri studi confermarono questa ipotesi e considerarono i pazienti in uno stato avanzato di SVA.<sup>132</sup>

Nello studio di Delgado et al. per una valutazione più accurata dell'outcome dei pazienti con SVA severa e FE preservata e basso gradiente, al flusso veniva integrato il parametro di Global Longitudinal Strain (GLS) ed emerse che i pazienti con flusso normale o GLS preservato (maggiore -15%) avevano una migliore sopravvivenza dopo sostituzione valvolare, rispetto ai pazienti con basso flusso o GLS compromesso (minore di -15%). Inoltre i parametri di flusso, cioè SVi, e di deformazione longitudinale miocardica, cioè GLS, vennero considerati come dei fattori prognostici negativi indipendenti, essenziali per la stratificazione di rischio e outcome dei pazienti.<sup>133</sup>

In un altro studio Jander et al. riconsiderarono la classe LFLG più come una situazione di SVA moderata mal diagnosticata a causa dell'inadeguatezza dei criteri raccomandati per la severità di SVA, dato che l'outcome per quanto riguarda gli eventi avversi cardiovascolari non differiva molto rispetto a quello dei pazienti con SVA moderata. Tuttavia, i gruppi dei

pazienti di Jender sono profondamente diversi da quelli di Hachicha. In particolare, i pazienti seguiti erano asintomatici con bassi fattori di rischio e severa-moderata stenosi aortica, mentre lo studio precedente includeva pazienti sintomatici, con comorbidità ed età avanzata. Inoltre, nello studio di Jander sono più frequenti gli errori di misurazione e la piccola taglia corporea, perciò l'inadeguatezza dei parametri sembra essere più frequente.<sup>134</sup>

Lo studio di Dahl et al. invece, supporta il concetto che la classe LFLG è chiaramente un'entità distinta di SVA, più che uno stadio che precede o segue la classica situazione di SVA con elevato gradiente nella storia natura della patologia.<sup>135</sup>

### *1.11.3 Implicazioni terapeutiche della classificazione alternativa flusso-gradiente*

Alla luce di questa classificazione alternativa e delle differenze patogenetiche e prognostiche nelle classi di pazienti, con il contributo di diversi studi prende forma anche una rivalutazione per la gestione terapeutica dei pazienti con SVA severa.

#### *SA con FE preservata*

Nei pazienti con SVA severa (AVA minore di 1 cm<sup>2</sup> o 0,6 cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup> se indicizzata) e con preservata FE ventricolare sinistra, la gestione terapeutica dovrebbe essere eseguita in modalità differente in base alla classe di appartenenza.

#### *NFLG*

In questa classe di pazienti la prognosi sembra essere relativamente preservata rispetto alle altre categorie perciò la gestione più adeguata consiste in un attento follow-up e terapia medica.

#### *NFHG*

In questa classe di pazienti i parametri di alto gradiente e ridotta area valvolare sono in corrispondenza con i valori proposti dalle linee guida. Se i sintomi sono chiaramente correlati alla SVA, l'intervento chirurgico è raccomandato. Se i pazienti sono asintomatici un cauto approccio nella valutazione dei fattori di rischio cardiovascolari ed eventi avversi è necessario prima di qualsiasi decisione riguardo l'intervento chirurgico. Sono da prendere in considerazione parametri come: l'impedenza valvulo-arteriosa (Zva), un valore che stima il post-carico globale del ventricolo sinistro; il peptide natriuretico atriale (BNP) che correla con la severità della SVA; il Monin's score, un parametro che combina i livelli sierici del



BNP con il sesso femminile e la velocità di picco trans-valvolare e può essere utile nell'individuare i pazienti che potrebbero avere eventi cardiovascolari avversi nell'arco di 2 anni; i test sotto sforzo, utili per smascherare i sintomi oltre che dare informazioni prognostiche.<sup>136 - 137 - 138</sup>

### *LFHG*

La decisione terapeutica da prendere in questa classe di pazienti, come nella precedente, risulta di solito semplice per la corrispondenza tra alto gradiente e ridotta area valvolare. Tuttavia è necessaria un'attenta valutazione dei potenziali errori di misurazione che potrebbero portare a un basso SVi, dato che studi recenti enfatizzano come una bassa gittata sistolica sia associata a un incrementato rischio di mortalità. Comunque quando sintomatici questi pazienti devono eseguire l'intervento chirurgico, quando asintomatici la gestione deve includere un attento follow-up.<sup>139</sup>

### *LFLG*

Innanzitutto in questa classe di pazienti dovrebbero essere esclusi errori di misurazione e la piccola taglia corporea prima di definire il caso come una LFLG. L'errore di misurazione più comune risulta essere la sottostima della gittata sistolica per un'inaccurata misurazione del tratto di efflusso ventricolare sinistro.

Una volta che queste situazioni sono state attentamente considerate e i pazienti risultano ancora LFLG deve essere valutata la possibilità di una SVA pseudo-severa.

I pazienti LFLG infatti potrebbero avere un basso gradiente e ridotta area valvolare, semplicemente perché il basso flusso non è sufficiente a consentire l'apertura valvolare adeguata. Questa situazione perciò potrebbe nascondere una stenosi lieve o moderata invece che severa. La bassa gittata sistolica e anche l'eventuale rimodellamento concentrico potrebbero derivare da un elevato post-carico, come si verifica in caso di ipertensione arteriosa. Intuitivamente questi soggetti non beneficiano di un trattamento di sostituzione valvolare, sarebbe invece più appropriato effettuare dei follow-up regolari e un trattamento anti-ipertensivo.

L'ecocardiografia sotto sforzo nei pazienti asintomatici o l'eco-stress con dobutamina nei pazienti sintomatici, sono utili per distinguere la LFLG vera dalla pseudo-severa. I pazienti con stenosi aortica *LFLG severa-vera* dimostrano la persistenza della discordanza tra gradiente pressorio e AVA anche durante il test, mantenendo un AVA al di sotto di 1 cm<sup>2</sup>; nei pazienti con stenosi aortica *LFLG pseudo-severa* invece si ottiene un incremento

dell'AVA.<sup>140 - 141</sup>

Quindi se la forma LFLG severa-vera è confermata, i pazienti sintomatici sembrerebbero trarre vantaggio dall'intervento chirurgico, mentre per i pazienti asintomatici sarebbero raccomandati follow-up regolari e la valutazione di ulteriori parametri e fattori di rischio prima di procedere all'intervento chirurgico.<sup>142 - 143</sup>

#### *SVA con FE ridotta*

I pazienti con disfunzione ventricolare sinistra severa di solito ricadono nella categoria LF e sono spesso sintomatici. Nella SVA severa (AVA minore di 1 cm<sup>2</sup> o 0,6 cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup> se indicizzata) e ridotta FE ventricolare sinistra la gestione terapeutica dovrebbe essere eseguita diversamente.

#### *LFHG*

La diagnosi di severità e la necessità di sostituzione valvolare nel caso della classe LFHG e ridotta FE non si discute, come sostenuto anche dalle linee guida attuali questi pazienti devono essere indirizzati all'intervento chirurgico.

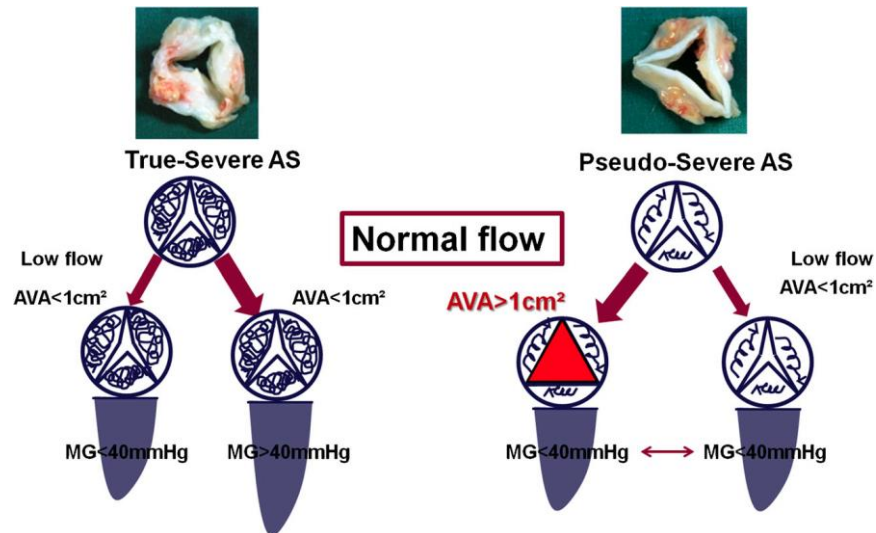
#### *LFLG*

La gestione della classe LFLG e ridotta FE è più delicata. In questi pazienti deve essere valutato se la disfunzione sistolica è una conseguenza dell'ostruzione valvolare o è dovuta a una cardiomiopatia che non ha niente a che vedere con la patologia valvolare.

Ad esempio, in seguito ad un esteso infarto miocardico, il ventricolo sinistro non sarebbe più in grado di pompare adeguatamente e generare una pressione adeguata ad aprire la valvola e perciò l'area dell'orifizio sarebbe impropriamente al di sotto di 1 cm<sup>2</sup>. In questi pazienti potrebbe perciò esserci una stenosi lieve o moderata invece che severa.

Per accertare la severità della stenosi, il flusso trans-valvolare dovrebbe essere normalizzato tramite eco-stress con dobutamina. Nei pazienti in cui la disfunzione ventricolare è una conseguenza della cardiomiopatia, ossia una SVA *pseudo-severa*, dopo la normalizzazione del flusso l'AVA tende ad incrementare e vi sarà un mancato o comunque insignificante incremento del gradiente trans-valvolare; nei pazienti in cui la disfunzione ventricolare è una conseguenza della patologia valvolare, ossia una SVA *severa-vera*, anche dopo la normalizzazione del flusso valvolare l'AVA non tende ad incrementare rimanendo al di sotto di 1 cm<sup>2</sup>, il gradiente medio invece in genere incrementa significativamente al di sopra dei 40 mmHg.

Perciò, riportando questi risultati sul piano clinico, se dopo il test la SVA è valutata come severa-vera, i pazienti possono essere indirizzati all'intervento chirurgico; se invece nei pazienti la SVA è valutata come pseudo-severa non devono essere inviati al trattamento chirurgico, ma seguiti con attenti follow-up ogni 6 mesi effettuando una terapia per lo scompenso cardiaco.<sup>130</sup>



**Figura 22:** ruolo della dobutamina nei pazienti con SVA LFLG e ridotta FE, nel distinguere tra forma severa e pseudo-severa di SVA.<sup>130</sup>

## 2. SCOPO DELLO STUDIO

Valutazione clinica, strumentale (ecocardiografica di base; advanced deformation imaging) e laboratoristica (micro-RNA plasmatico) di pazienti affetti da stenosi valvolare aortica severa sintomatica, candidati ad intervento di sostituzione valvolare aortica chirurgica o percutanea: studio di correlazione degli indici di deformazione miocardica con parametri clinici, ecocardiografici convenzionali e bio-umorali.

Nel dettaglio gli obiettivi dello studio sono:

- 1) *Confermare* in pazienti con stenosi valvolare aortica severa la presenza di alterazioni dei parametri di deformazione miocardica;
- 2) *Dimostrare* la relazione tra i parametri 2D-STI e livelli di espressione del miRNA-21 plasmatico;
- 3) *Confrontare* i parametri ecografici e laboratoristici dei pazienti con stenosi valvolare aortica severa, in relazione alla classificazione alternativa flusso-gradiente.

### 3. MATERIALI E METODI

66 pazienti consecutivi (Età 78,4; 60,7% sesso femminile) affetti da valvulopatia aortica calcifica-degenerativa con stenosi di severa entità ( $AVA_i < 0.6 \text{ cm}^2/\text{m}^2$ ) sintomatica (Classe NYHA all'ingresso: 2.20; CCS 0,59; esordio con sincope nel 9% dei casi), candidati a sostituzione valvolare (Euroscore II 3.49; Logistic Euroscore 11,2) presso il Dipartimento Cardio-Toracico di Pisa, sono stati sottoposti a valutazione integrata pre-operatoria includente:

- valutazione *clinica* (Anamnesi, esame obiettivo, stima del rischio operatorio secondo criteri Euroscore, calcolo della Body Surface Area);
- *elettrocardiografica*;
- *bioumorale* (esami ematochimici di routine, valutazione plasmatica del miRNA21 in 54 dei pazienti);
- *ecocardiografica trans-toracica* (modalità M-Mode, 2D, Color Doppler, Tissue Doppler Imaging, Speckle Tracking Imaging);
- *cateterismo cardiaco*.

#### 3.1 ECOCARDIOGRAFIA CONVENZIONALE

In tutti i pazienti è stata eseguita un'acquisizione ecocardiografia standard e mirata alla valutazione Speckle Tracking, secondo le attuali linee guida.

Lo studio ecocardiografico è stato eseguito con apparecchio dedicato (Vivid-7, General Electric-Vingmed, Milwaukee/Horten, WI-USA/Norway) e gating ECG.

Le immagini sono state acquisite con pazienti in decubito laterale sinistro o destro per ottenere una proiezione mirata alla valutazione della valvulopatia aortica, a una profondità variabile di 14-20 cm.

I dati sono stati acquisiti con trasduttore da 3,5 MHz (M4S) in proiezione parasternale asse lungo, asse corto e nelle proiezioni apicali (2,3,4,5 camere). Per tutte le misure in cui era necessario è stata effettuata indicizzazione (i) per la superficie corporea.

### 3.2.1 Valutazione dell'ipertrofia e funzionalità sistolica ventricolare sinistra

Le *dimensioni lineari ventricolari sinistre* sono state calcolate con metodica M-mode (qualora non eseguibile, anche mediante metodica 2D) dalla parasternale asse lungo, includendo:

- diametri cavitari indicizzati e non: End-Diastolic Diameter (EDD/EDDi), End-Systolic Diameter (ESD/ESDi), Fractional Shortening (FS);
- spessori settali e della parete infero-laterale in sistole e diastole: Interventricular-Septum Diameter-sys-dia (IVSs/d), Posterior-Wall Diameter-sys/dia (PWDs/d).

L'utilizzo di misure lineari per derivare informazioni concernenti le dimensioni e la funzione sistolica globale del ventricolo sinistro, presuppone l'esistenza di una geometria simmetrica e di una contrattilità uniforme; è intuitivo che in presenza di anomalie geometriche o di contrattilità, le misurazioni effettuate in un unico punto possono non essere rappresentative della globalità del ventricolo sinistro. Inoltre, perché le misure lineari siano accurate è necessario che il fascio ultrasonoro sia perpendicolare al ventricolo; quanto più il fascio M-mode tenderà ad essere tangenziale, tanto maggiore sarà la sovrastima delle misurazioni lineari. Fatto salvo queste limitazioni, la riproducibilità intra e inter osservatore delle misurazioni lineari M-mode è soddisfacente.

I *volumi ventricolari sinistri* (End-Diastolic/End-Systolic Volume, EDV/ESV) sono stati calcolati mediante metodo della sommazione dei dischi (regola di Simpson). Il volume del ventricolo sinistro viene ottenuto sommando il volume di una serie di sezioni cilindriche sovrapposte; quanto più numerosi sono i dischi in cui viene scomposto il ventricolo, tanto più accurata sarà la stima finale del volume. Gli ecografi di ultima generazione includono il software necessario per il calcolo dei volumi utilizzando questo metodo; compito dell'operatore è di tracciare il bordo endocardico e la lunghezza del ventricolo (distanza piano mitrale-apicale).

Questa operazione viene effettuata in due proiezioni (apicale 4 e 2 camere) e ha il vantaggio di non richiedere assunzioni teoriche della forma ventricolare e risulta pertanto applicabile in presenza di geometria distorta.

Dai volumi ricavati possiamo derivare la Frazione di Eiezione (Ejection Fraction, EF).

La EF è stata calcolata anche secondo metodica di Teicholz dalla proiezione parasternale, anche se non raccomandata dalle specifiche del American Society of Echocardiography, la concordanza tra EF calcolata linearmente e con metodica Simpson (2D) è risultata ottimale.

La *massa ventricolare sinistra* (Left Ventricular Mass, LVM) è stata calcolata con metodica bidimensionale e indicizzata (LVMI) per il Body Surface Area (BSA). La stima della massa ventricolare sinistra si può ottenere anche con l'approccio M-mode, ma le informazioni perdono attendibilità in presenza di distorsioni della geometria ventricolare o di dissinergie localizzate. Tutti gli algoritmi di calcolo sia M-mode, che bi o più recentemente tridimensionali sono basati sul principio della sottrazione del volume della cavità ventricolare sinistra dal volume globale (il cui perimetro esterno è rappresentato dall'epicardio), con l'intento di sottrarre il volume di sangue e ricavare unicamente la massa ventricolare. La massa del ventricolo è ottenuta moltiplicando il volume ricavato per la densità del miocardio (1,04 gr/ml).

In dettaglio la formula matematica per calcolare la massa del ventricolo sinistro a partire dalle misure lineari secondo quanto sopra detto è:

$$LVM = 0,8 \times 1,04 ((EDD + PWDd + SIV)^3 - EDD^3) + 0,6$$

Dove PWDd (Posterior-Wall Diastolic diameter) e IVS (Inter-Ventricular Septum) indicano rispettivamente lo spessore diastolico della parete posteriore e del setto interventricolare. Questa formula è stata validata da studi autoptici e se le misurazioni lineari sono accurate ha dimostrato buona riproducibilità. Come tutti i calcoli complessi, il loro utilizzo è stato enormemente semplificato da algoritmi di calcolo già inclusi nel software delle apparecchiature ecocardiografiche più recenti.

L'ipertrofia ventricolare sinistra è stata definita in presenza di valori di LVMI superiori a 115 g/m<sup>2</sup> nell'uomo e 95 g/m<sup>2</sup> nella donna. Al fine di caratterizzare il tipo d'ipertrofia è stato calcolato il Relative Wall Thickness (RWT) calcolato dal rapporto tra il doppio del PWD e l'EDD. Altro parametro utile per valutare il tipo d'ipertrofia è il rapporto tra massa e volume tele-diastolico (M/V ratio). Si parla d'ipertrofia concentrica se LVMI è aumentato e RWT è maggiore di 0,42; e d'ipertrofia eccentrica se LVMI è alterato ma il RWT nella norma. Si parla invece di rimodellamento concentrico quando LVMI è nella normale e RWT supera il cut-off di 0,42.

Il calcolo delle *dimensioni lineari* (Left Atrial Dimension, LAD) area e volume atriale sinistro indicizzato e non (Left Atrium Volume LAVi/LAV) è stato effettuato con metodica lineare dalla proiezione parasternale e secondo metodica della sommazioni dei dischi dalla proiezione 2 e 4 camere apicali.

A completamento dello studio dei parametri di funzione sistolica convenzionali è stata valutata la velocità sistolica di picco settale e laterale ( $S's/S'l$ ) al Tissue Doppler Imaging (TDI) anulare.

La stima della funzione sistolica destra è stata effettuata mediante calcolo della Tricuspidal Annular Plane Systolic Excursion (TAPSE).

Lo *Stroke Volume* (SV-VTI) volume sistolico o gittata sistolica, in altre parole quantità di sangue pompato dal ventricolo a ogni sistole è stato calcolato moltiplicando l'integrale velocità tempo (Velocity Time Integral, VTI) con metodica doppler pulsato e il diametro del tratto di efflusso sinistro (Left Ventricular Outflow Tract, LVOT) in parasternale asse lungo, quindi indicizzato per la superficie corporea (SV-VTIi).

Il calcolo della *pressione sistolica in arteria polmonare* (Pulmonary Artery Pressure systolic PAPs) è stato effettuato mediante campionamento della velocità di picco del jet da rigurgito tricuspidalico (se presente), derivandone il gradiente massimo e sommandovi la stima della pressione atriale destra valutata sulla base di anatomia atriale e collassabilità della vena cava inferiore.

### 3.2.2 Valutazione della severità della stenosi valvolare aortica

La velocità di picco e medie trans-valvolari aortiche ( $V_{max}$  e  $V_{med}$ ) sono state calcolate con metodica doppler continuo, derivandone successivamente il gradiente massimo ( $G_{max}$ ) secondo l'equazione di Bernulli. È stato inoltre calcolato il rapporto tra velocità di picco trans-valvolare e velocità a livello del tratto di efflusso (velocity ratio, V-Ratio).

Il gradiente medio ( $G_{med}$ ) risultante dalla stima dei gradienti istantanei su traccia doppler continua durante eiezione ventricolare.

L'area valvolare aortica (Aortic Valve Area, AVA) è stata calcolata secondo l'equazione di continuità e indicizzata per la superficie corporea (AVAi).

È stata inoltre effettuata una stima qualitativa di un eventuale insufficienza valvolare aortica associata mediante color doppler, dopo adeguamento del guadagno e del limite di Nyquist.

La stima del post-carico globale è stata valutata attraverso l'impedenza valvulo-arteriosa ( $Z_{va}$ ), calcolata come la somma del gradiente medio trans-valvolare più la pressione arteriosa sistolica, diviso la gittata sistolica indicizzata per la superficie corporea.



### *3.2.3 Valutazione della funzione diastolica ventricolare sinistra*

La funzionalità diastolica è stata valutata mediante velocità trans-mitralica al doppler pulsato (onda E, onda A, rapporto E/A, Deceleration Time DT) e TDI (onda E' e A') a livello settale e laterale. È stato inoltre valutato il rapporto E/E' medio (setto/laterale) per fornire una stima non invasiva delle prestazioni telediastoliche ventricolari sinistre.

## **3.2 SPECKLE TRACKING IMAGING**

È stata effettuata una valutazione complessiva dei principali parametri di deformazione miocardica (strain, strain-rate sistolico e proto-diastolico) utilizzando lo Speckle Tracking Imaging bidimensionale (2D-STI). Lo studio si è concentrato sui parametri di deformazione longitudinale, considerate le maggiori evidenze in letteratura in termini prognostici e le significative limitazioni (elevata variabilità inter ed intra-operatore, scarsa riproducibilità) esistenti per i parametri circonferenziali e trans-murali anche in presenza di ipertrofia ventricolare sinistra, nonché le limitazioni dovute alla finestra acustica parasternale (habitus pazienti, comorbidità).

Sono state pertanto acquisite immagini bidimensionali in scala di grigio, in proiezione apicale 2, 4 camere e asse lungo, con un frame-rate compreso tra 50 e 110 frames/secondo. I dati sono stati acquisiti con gating ECG, durante apnea inspiratoria, con una media di 3 cicli (6 per i pazienti in fibrillazione atriale) per proiezione e rielaborati successivamente su workstation dedicata in modalità off-line, secondo modalità precedentemente definite.

In sintesi, il contorno endomiocardico viene tracciato manualmente in un frame telesistolico, selezionato tra i disponibili in base alla qualità e alla presenza di artefatti. Il software provvede quindi a tracciare una regione d'interesse (Region Of Interest, ROI) che ingloba l'intera parete miocardica. Viene pertanto effettuata una verifica del tracking ed un eventuale adeguamento della larghezza della regione d'interesse, se necessario.

Si esegue una valutazione dello strain segmentario dividendo ciascuna delle 3 proiezioni acquisite in 6 segmenti. Si considera accettabile una misurazione che consenta in ogni proiezione la valutazione dei parametri di deformazione in almeno 4 dei 6 segmenti.

Infine, sono stati ricavati i valori di strain longitudinale sistolico di picco per ogni segmento, la cui media complessiva ha fornito i valori globali (Global Longitudinal Strain, GLS%).

Per la variabilità d'interpretazione intra e inter-osservatore è stato valutato il coefficiente globale di correzione inter-classe (ICC).

### 3.3 CATETERISMO CARDIACO

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a coronarografia pre-intervento e a cateterismo cardiaco sinistro e aortografia, qualora consentito dall'anatomia valvolare o in caso d'incongruenze all'ecocardiografia. Attraverso il cateterismo cardiaco è possibile valutare la *pressione telediastolica*, *telesistolica ventricolari sinistre*, il *gradiente picco a picco* e il grado di *insufficienza aortica* associata. Quest'ultimo ha mostrato di concordare strettamente con il dato ecocardiografico.

La stima della pressione tele-diastolica ventricolare sinistra ottenuta con ecocardiografia ha mostrato una stretta concordanza con il parametro ricavato dal cateterismo, così come il gradiente massimo ecocardiografico e il gradiente picco-picco emodinamico.

### 3.4 CAMPIONI EMATICI

I campioni ematici sono stati raccolti in provette per RNA (PAXgene blood RNA tube) contenenti un reagente che lisa le cellule ematiche e stabilizza rapidamente l'RNA intracellulare (PreAnalytiX), riducendone la degradazione e preservandone il profilo d'espressione genica. Dopo raccolta le provette sono state depositate per 20-24 ore a temperatura ambiente prima di essere congelate a -80°.

Per l'isolamento di RNA da sangue umano intero è stato usato un kit d'estrazione (PAX gene blood miRNA kit) che consente di stabilizzare e purificare molecole di RNA lunghe più di 18 nucleotidi inclusi i microRNA. Con questo sistema l'estrazione di RNA avviene con metodo di adsorbimento su membrana di silice.

Successivamente le specie di miRNA estratte sono state convertite in sequenze di DNA complementari (cDNA) mediante l'uso di una *trascrittasi inversa*, generando così filamenti di DNA che risultano essere molto più stabili e meno sensibili a processi di degradazione rispetto all'RNA.

Il DNA complementare generato è stato usato per la *reazione a catena della polimerasi in real-time* (real-time PCR), con primer per il miRNA in studio. Questo procedimento amplifica i miRNA nei diversi campioni e dopo circa 40 cicli attraverso l'emissione di fluorescenza proporzionale alla quantità di miRNA replicato, permette un'analisi quantitativa dei dati.

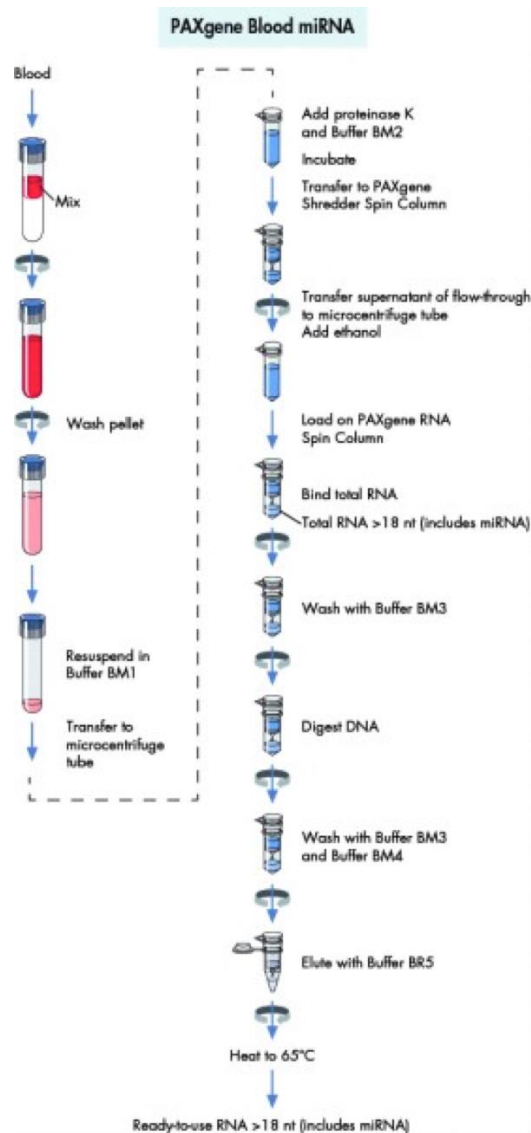
### *2.5.1 Estrazione RNA da sangue intero*

La raccolta del sangue intero è la prima fase per lo studio dell'RNA. Il numero di copie delle singole specie di RNA nel sangue intero può variare di oltre 1000 volte durante la conservazione e il trasporto a temperatura ambiente. Ciò è provocato dalla rapida degradazione dell'RNA e dall'espressione indotta di alcuni geni dopo il prelievo ematico. Tali modifiche nel profilo dell'RNA impediscono di effettuare studi attendibili sull'espressione genica. Per un'analisi accurata dell'espressione genica nel sangue intero umano è quindi essenziale un metodo per conservare il profilo di espressione dell'RNA durante e dopo la flebotomia. Perciò è necessario utilizzare dei sistemi che consentano il prelievo, la stabilizzazione, la conservazione e il trasporto di sangue intero umano, nonché un rapido ed efficiente protocollo per la purificazione dell'RNA cellulare.

Protocollo di estrazione RNA da sangue conPAX gene blood miRNA kit:

- lasciare il tubo PAXgene a temperatura ambiente per almeno 2 ore in modo da ottenere la completa lisi delle cellule del sangue;
- centrifugare il tubo RNA PAXgene per 10 minuti a 3.000-5.000 g per ottenere la separazione in fasi dei campioni e la precipitazione degli acidi nucleici;
- rimuovere il surnatante e aggiungere 4 ml di acqua RNase-free alla parte sedimentata (pellet), miscelare su vortex fino a che il pellet non si è completamente risospeso e centrifugare per 10 minuti a 3.000-5.000 g;
- rimuovere il surnatante, aggiungere 350 µl di buffer BM1 (tampone di risospensione) e miscelare su vortex fino a che il pellet non si è completamente risospeso;
- trasferire il campione in un'eppendorf da 1,5 ml, aggiungere 300 µl di buffer BM2 (tampone di legame) e 40 µl di proteinasi K, miscelare su vortex per 5 secondi e incubare per 10 minuti a 55°C in un termomixer in agitazione: questo passaggio consente di trattenere l'RNA in modo da assicurare un successivo legame con le membrane silconiche delle colonne di purificazione, nel contempo l'aggiunta della proteinasi K consente di eliminare le proteine rimaste in soluzione che ridurrebbero la qualità e la resa del prodotto finale;
- trasferire il campione dentro a PAXgene shredder spin column inserita in una provetta di reazione da 2 ml e centrifugare per 3 minuti alla massima velocità (non superiore a 20.000 g): questo procedimento consente di omogeneizzare il lisato e rimuovere i detriti cellulari;
- trasferire attentamente tutto il surnatante dalla colonna, costituito da residui proteici precedentemente digeriti, in una nuova provetta da 1,5 ml senza perturbare il pellet;

- aggiungere 700 µl d'isopropanolo 100% per la precipitazione del RNA e miscelare su vortex;
- trasferire i 700 µl di campione in una PAXgene RNA spin column, inserirla in un processing tube da 2 ml e centrifugare per 1 minuto a 8.000-20.000 g: la maggior parte del RNA rimarrà legato alla membrana silconica che costituisce il fondo della spin column, mentre l'eluato viene eliminato;
- lo step di centrifugazione viene ripetuto nuovamente aggiungendo altri 700 µl di isopropanolo ed eliminando l'eluato;
- aggiungere 350 µl di buffer BM3 (tampone di lavaggio) nella PAXgene RNA spin column, centrifugare per 15 secondi a 8.000-20.000 g e eliminare l'eluato;
- la miscela, utilizzata per eliminare eventuali residui di DNA precipitati insieme al RNA, viene ottenuta aggiungendo 10 µl di DNase I stock solution a 70 µl di buffer RDD (tampone di degradazione del DNA) in una eppendorf da 1,5 ml, miscelando delicatamente e centrifugando brevemente;
- aggiungere la mix ottenuta direttamente sulla membrana della PAXgene RNA spin column ed incubare a temperatura ambiente per 15 minuti;
- aggiungere 350 µl di buffer BM3 per lavare la membrana di purificazione e centrifugare 15 secondi a 8.000-20.000g;
- trasferire la spin column in un nuovo processing tube, aggiungere 500 µl di buffer BM4 (tampone di lavaggio concentrato), centrifugare per 15 secondi a 8.000-20.000 g, eliminare l'eluato e ripetere il lavaggio una volta;
- trasferire la spin column in un nuovo processing tube e centrifugare a 8.000-20.000 g per 1 minuto affinché l'etanolo residuo, contenuto nel buffer BM4, sia definitivamente eliminato e non riduca la purezza del prodotto finale;
- trasferire la spin column in una nuova eppendorf da 1,5 ml, aggiungere 40 µl di buffer BR5 (tampone di eluizione) direttamente sulla membrana della spin column, centrifugare per 1 minuto a 8.000-20.000 g per eluire l'RNA e ripetere questo step utilizzando la stessa eppendorf di raccolta;
- porre l'eluato nell'incubatore per 5 minuti a 65°C senza agitazione per risospendere bene l'RNA nell'elution buffer e raffreddare immediatamente in ghiaccio;
- conservare l'RNA estratto a -20°C o -70°C se non viene utilizzato immediatamente.



**Figura 23:** procedura per l'isolamento del RNA da sangue intero con PAXgene Blood miRNA kit.

### 3.5.2 Retro-trascrizione RNA

La retro-trascrizione consiste nella sintesi di una molecola di DNA complementare a partire da RNA.

L'enzima che catalizza questa reazione è la trascrittasi inversa, consiste in un particolare tipo di DNA polimerasi che utilizza come filamento stampo una molecola di RNA partendo dall'estremità 3'.

L'enzima trascrittasi inversa per catalizzare la sintesi di una catena di DNA complementare all'RNA necessita di:

- RNA stampo;

- deossi-ribonucleotidi-trifosfato, cioè i singoli nucleotidi necessari per la sintesi del nuovo filamento di cDNA;
- primer che costituiscono gli inneschi per l'enzima e possono essere di due tipi: *random examere primer*, cioè sequenze oligonucleotidiche di 6 basi che legano in maniera casuale le molecole di RNA o *oligonucleotide primer di poli-T*, cioè sequenze oligonucleotidiche costituite da basi di timidina che legano la coda poli-A dell'RNA;
- soluzione buffer, cioè una soluzione salina acquosa che mantiene stabile il Ph;
- cloruro di magnesio (MgCl<sub>2</sub>) che svolge un ruolo di cofattore per la trascrittasi inversa e influenza l'appaiamento del primer.

Durante la reazione di RT i primer si legano alle specifiche sequenze complementari di RNA per venir poi estesi dall'enzima retro-trascrittasi inversa, formando un composto ibridato dato da un filamento di cDNA e RNA. Il composto può essere direttamente utilizzato nella reazione di real-time PCR, per determinare la quantità di trascritti.

Nello specifico i componenti usati nella nostra reazione di retro-trascrizione sono:

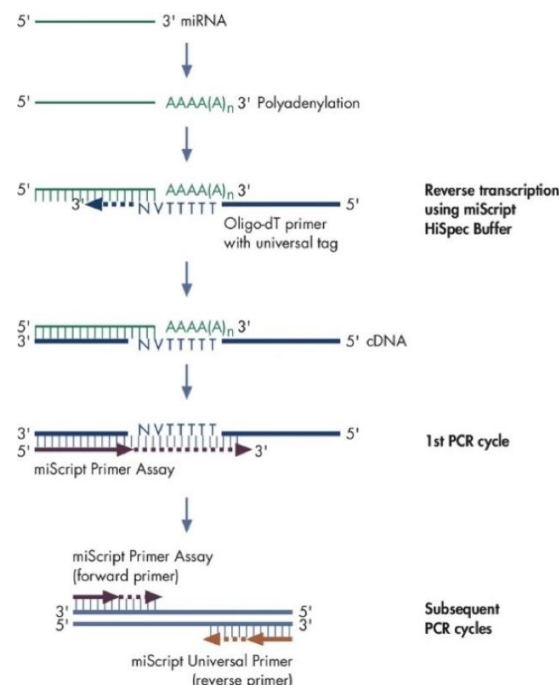
- 5x miScript Hispec buffer (facilita la conversione selettiva di microRNA maturo a cDNA mentre la conversione di RNA lunghi come mRNA è soppressa);
- miScript Nucleics Mix (contenente dNTPs, rATP, oligo-dTprimers e un controllo interno di RNA sintetico che è utilizzato per verificare il corretto svolgimento della reazione);
- acqua RNase-free;
- miScript Reverse Trascriptase Mix (contente una miscela di poliA polimerasi e trascrittasi inversa);
- i campioni di RNA estratto.

Protocollo retro-trascrizione RNA:

- scongelare il campione di RNA in ghiaccio, scongelare 10xmiScript Nucleics Mix e 5x miScript HiSpec Buffer in una stanza alla temperatura di 15-25 °C;
- centrifugare brevemente per raccogliere il residuo di liquido sulle pareti delle provette e dopo mettere la provetta in ghiaccio;
- preparare la master mix per la retro-trascrizione con 5x miScript Hispec buffer (4µl), 10x Nucleics Mix (2 µl), miScript reverse transcriptase mix (2 µl) e quantità variabile di acqua RNase-free, miscelare e poi mettere in ghiaccio: la master mix di trascrizione inversa

prodotta contiene tutti i componenti richiesti per la sintesi del primo stand di cDNA, eccetto il campione di RNA estratto;

- aggiungere quindi i campioni di RNA in ogni provetta contenente la master mix di trascrizione inversa, miscelare delicatamente, centrifugare brevemente e poi mettere in ghiaccio;
- incubare per 60 minuti a 37 °C per permettere il processo di retro-trascrizione, dopo incubare per 5 minuti a 95 °C per inattivare miScript Revers Trascriptase Mix e infine mettere in ghiaccio;
- diluire il prodotto di reazione, miscelare delicatamente, centrifugare lievemente e continuare con la real-time PCR.



**Figura 24:** conversione di miRNA maturi a cDNA con miScript.

### 3.5.3 Real-time PCR

La reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR) è un metodo in vitro di amplificazione di acidi nucleici. La PCR permette una sintesi esponenziale di un segmento di DNA a partire da un filamento di DNA stampo.

Si utilizza un enzima, la DNA-polimerasi, che lega le sequenze oligonucleotidiche costruite in modo tale da legarsi all'estremità della sequenza d'interesse.

La miscela di amplificazione deve perciò contenere:

- sequenze target, consistenti nel materiale genetico contenente le regioni che si desiderano amplificare;
- DNA polimerasi termo-resistente e termo-stabile;
- due primers che consistono in degli oligonucleotidi a singolo filamento complementari rispettivamente all'estremità 3' e 5' della sequenza target, chiamati perciò senso e anti-senso: costituiscono gli elementi d'innescio per l'attività della DNA polimerasi;
- soluzione buffer, cioè una soluzione salina acquosa che mantiene stabile il Ph;
- deossi-ribonucleotidi-trifosfato (dNTPs), cioè i singoli nucleotidi necessari per la sintesi di nuove eliche;
- nella soluzione si trova anche cloruro di magnesio ( $MgCl_2$ ) che svolge un ruolo di cofattore per la DNA polimerasi e influenza l'appaiamento del primer allo stampo.

La reazione prevede il susseguirsi di cicli di amplificazione realizzati grazie all'alternanza di specifici cicli di temperature. Le fasi che si possono distinguere, per ogni ciclo, sono tre: la denaturazione, l'appaiamento e infine l'estensione.

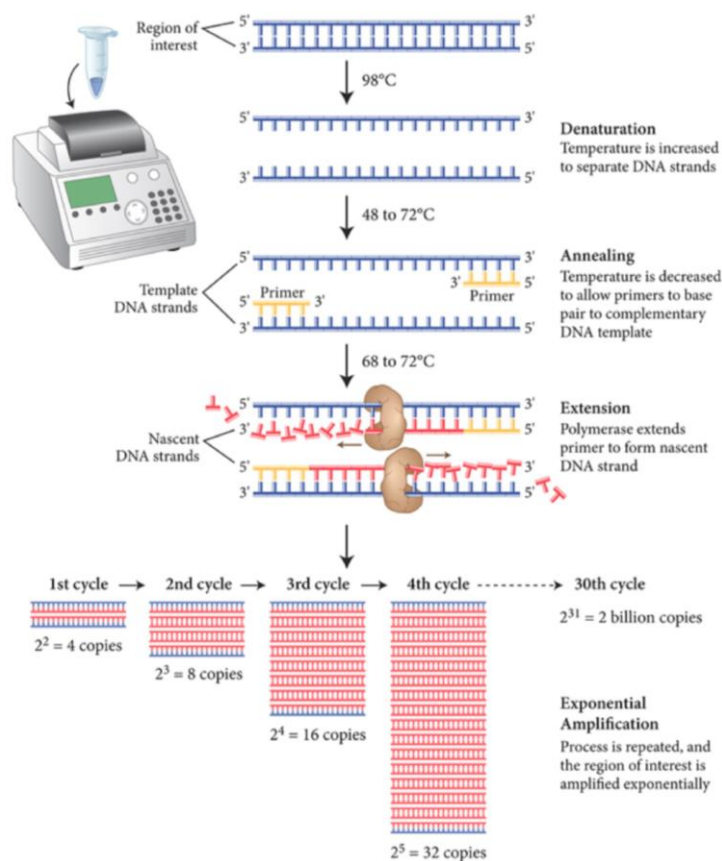
Durante la denaturazione (*denaturation*) si raggiungono alte temperature di circa 95 °C. In questa fase avviene la separazione della doppia elica del DNA stampo in due filamenti singoli. Ciò avviene poiché l'alta temperatura rende i legami idrogeno tra le catene instabili permettendone la rottura.

Nella seconda fase, l'appaiamento (*annealing*), la temperatura viene abbassata tra i 55°C e i 65°C e a queste temperature si verifica il legame dei primer alle sequenze di cDNA a singola elica ad essi complementari localizzati alle estremità dei filamenti d'interesse.

Nell'ultima fase, quella di estensione (*extention*), la temperatura viene leggermente alzata per massimizzare l'azione dell'enzima (la temperatura di lavoro dell'enzima è solitamente tra 68-72 °C) in questa fase i primer oligonucleotidici vengono estesi dalla DNA polimerasi che incorpora i singoli deossi-ribonucleotidi-trifostato complementari al DNA stampo.

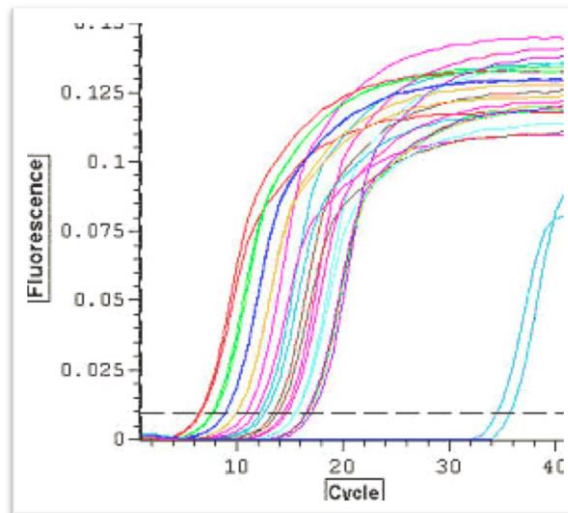
Il ciclo di amplificazione, costituito dalle tre fasi appena descritte, viene ripetuto 30-40 volte per ottenere un'amplificazione esponenziale della sequenza target. Negli ultimi cicli di amplificazione la reazione rallenta a causa del consumo di reagenti e della riduzione di attività della polimerasi, fino al raggiungimento di un plateau, nel quale non si ha più amplificazione a causa dell'esaurimento dei reagenti e dell'accumulo di prodotti.





**Figura 25:** fasi del processo della PCR.

Uno sviluppo della tecnica di PCR consiste nella real-time PCR. La real-time PCR consente di quantificare la sintesi del prodotto di PCR ad ogni ciclo di amplificazione in tempo reale. Questo permette di effettuare un'analisi quantitativa del DNA stampo iniziale. Il segnale che viene quantificato è rappresentato dalla fluorescenza emessa da fluorofori, cioè coloranti fluorescenti in grado di legarsi alle molecole di DNA ad ogni ciclo di amplificazione. I fluorofori usati in real-time PCR sviluppano fluorescenza quando vengono incorporati nei filamenti di DNA neo-sintetizzati. La quantità di prodotto amplificato può essere quindi determinata a ogni ciclo di amplificazione, rilevando al termine della fase di estensione la radiazione emessa dal fluoroforo. Uno dei fluorofori più utilizzati è il SYBR green, una molecola fluorescente che durante la reazione di PCR si intercala nel doppio filamento del DNA. Durante la fase di denaturazione SYBR green si trova libero nella miscela di reazione, successivamente nella fase di appaiamento si posiziona in maniera aspecifica nel solco minore del DNA, infine nella fase di estensione il colorante si intercala nella molecola di DNA e quando eccitato emette fluorescenza in modo proporzionale al numero di copie di DNA prodotte a loro volta proporzionali al contenuto di DNA iniziale.



**Figura 26:** curve di fluorescenza ottenute dal processo di real-time PCR.

Nello specifico i componenti usati nella nostra reazione real-time PCR sono:

- 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (contenente QuantiTect SYBR Green PCR buffer per facilitare la reazione di replicazione, DNA polimerasi, dNTPs, il fluoroforo SYBR green);
- 10x miScript Universal Primer (dei primer universali per l'innesco della reazione);
- 10x miScript Primer Assay (dei primer specifici per i miRNA da analizzare);
- acqua RNase-free;
- i campioni di cDNA estratto.

protocollo real-time PCR:

- scongelare 2x QuantiTect SYBR green PCR Master Mix, 10x miScript Universal Primer, 10x miScript Primer Assay, i campioni di cDNA e infine l'acqua RNase-free, in una stanza alla temperatura di 15-25°C;
- preparare un mix di reazione con 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (12,5 µl), 10x miScript Universal Primer (2,5µl), 10xmiScript Primer Assay (2,5µl) e quantità variabile di acqua RNase-free: il mix di reazione prodotta contiene tutti i componenti richiesti per la replicazione eccetto il campione di cDNA;
- preparare quindi il campione di cDNA nei pozzetti;
- aggiungere il mix di reazione nei pozzetti contenti il campione di cDNA e miscelare accuratamente e delicatamente;
- sigillare attentamente la piastra con una copertura e centrifugare per 1 minuto a 1000 g in una stanza temperata 15-25 °C;

- programmare il ciclo di real-time PCR: 15 minuti a 95 °C per il passaggio iniziale di attivazione della DNA polimerasi, iniziare il ciclo con le 3 fasi di denaturazione (15 secondi a 95 °C) appaiamento (30 secondi a 55 °C) ed estensione (30 secondi a 70 °C) e impostare la ripetizione del ciclo per 40 volte;
- mettere la piastra nel real-time cycler e iniziare il processo di replicazione.

Per accertare l'accuratezza e riproducibilità della metodica e per quantificare i valori di miRNA ottenuti è necessaria la normalizzazione dei dati, occorre cioè comparare l'ammontare di miRNA target con un RNA endogeno di riferimento presente in tutti i campioni.

Nella reazione di amplificazione real-time PCR, la fluorescenza è correlata al numero di cicli effettuati, dall'analisi grafica dei dati si registra una curva (cicli/fluorescenza) con andamento sigmoide ed in particolare il ciclo soglia (threshold Cycle, Ct), ossia il ciclo in cui si evidenzia il primo rilevante incremento della fluorescenza, serve come parametro per calcolare l'ammontare iniziale in ogni campione. Quindi il livello di espressione genica può essere determinato comparando la curva del campione d'interesse e la curva del campione di riferimento e in particolare il rapporto dei diversi valori del Ct tra le due curve.

### 3.5 ANALISI STATISTICA

I *dati continui* sono descritti in termini di media e intervalli di confidenza (95%CI); diversamente con mediana.

I *dati categorici/quantitativi* sono riportati come tassi o percentuali.

E' stata valutata la normalità dei parametri saggiati mediante *Test di Kolmogorov-Smirnov*.

I livelli di miRNA plasmatico sono misurati in tutti i pazienti e considerati come variabili continue. Le variabili continue sono comparate utilizzando il *Test di Wilcoxon-Mann-Whitney* noto pure come *test U di Mann-Whitney* o *test di Wilcoxon* per variabili non gaussiane, utile per verificare se due campioni statistici provengono dalla stessa popolazione.

È stato inoltre utilizzato il test di *Kruskal-Wallis test (H-test)*, un'estensione del test di Wilcoxon che permette di confrontare più di due campioni statistici, per verificare che tali gruppi provengano da una stessa popolazione e quindi poter effettuare un confronto tra l'uguaglianza delle mediane dei diversi gruppi.

Per stabilire se esiste una relazione fra due variabili, ovvero se la variabilità di una dipende dall'altra, abbiamo utilizzato tecniche statistiche basate sulla *correlazione* e sulla *regressione*. Il *metodo di regressione lineare multivariata* è stato impiegato per effettuare predizioni quantitative relativamente ad una o più proprietà del sistema in studio. Il loro scopo è di trovare la migliore relazione tra un insieme di variabili che descrive gli oggetti studiati e un insieme di risposte misurate degli stessi oggetti. L'obiettivo delle tecniche di regressione multivariata è quindi quello di trovare una relazione tra una o più variabili indipendenti (dette predittori). Nel nostro caso, per la selezione dei predittori, è stato utilizzato un *modello di regressione multivariato con approccio Stepwise*.

Per analizzare il grado di correlazione tra differenti parametri analizzati è stato valutato il *Coefficiente di correlazione di Bravais-Pearson ( $r$ )* per variabili con distribuzione normale o il *Coefficiente di correlazione di Spearman ( $r^*$ )* in caso di parametri distribuiti non normalmente. Il coefficiente di correlazione di Pearson viene utilizzato per valutare quantitativamente la forza dell'associazione fra due variabili quantitative continue; esso misura sostanzialmente il grado d'interpolazione fra i punti e la retta di regressione. Il coefficiente  $r$  è un valore non dimensionale compreso fra -1 e 1 e simmetrico (il legame che collega  $x$  e  $y$  è lo stesso che c'è tra  $y$  e  $x$ ). Se  $r > 0$  la correlazione è positiva (ossia diretta) e le due variabili variano in modo concorde; se  $r < 0$  la correlazione è negativa e le due variabili

variano in modo discorde (correlazione inversa). Quando  $r=1$  o  $r=-1$  abbiamo correlazioni perfette (rispettivamente *correlazione perfetta diretta* e *correlazione perfetta indiretta*) ed i punti giacciono tutti sulla retta di regressione.

È stato infine calcolato  $R^2$ , *coefficiente di determinazione* il quale fornisce la forza della relazione rappresentata dalla retta di regressione. Se moltiplicato per 100,  $R^2$  rappresenta la percentuale di variabilità della variabile dipendente Y dalla variabilità della variabile indipendente X.

Sono stati tracciati i relativi diagrammi di dispersione (*Correlation plot*).

Il *p-value* ( $p$ ) di un test di verifica d'ipotesi indica la probabilità di ottenere un risultato pari o più estremo di quello osservato, supposta vera l'ipotesi nulla. Talvolta viene anche chiamato *livello di significatività osservato*. Nel nostro caso,  $p \leq 0.05$  e quindi una serie di dati viene detta *statisticamente significativa* se il suo valore  $p$  è minore o uguale a 0,05.

È stata eseguita l'analisi della varianza (ANOVA) per valutare due o più gruppi di dati confrontando la variabilità interna a questi gruppi e la variabilità tra i gruppi.

Nel nostro studio è stato effettuato un pre-test all'analisi ANOVA, ossia il *test di Levene* per l'omogeneità della varianza, al fine di verificare che ciascun gruppo di analisi avesse la stessa varianza.

In seguito è stato eseguito un confronto a coppie tra i diversi gruppi, tramite test post-hoc come il *Tukey-Kramer's* e il *metodo di Scheffé*.

E' stata inoltre valutata la *concordanza* ( $k$ ) o il *coefficiente di correlazione intra e inter-operatore* (Metodo di Bland Altman) per misurazioni analoghe eseguite con differenti metodiche (ecocardiografia; cateterismo). Sono state considerate affidabili misurazioni con  $p < 0.05$ .

Al fine di preservare il significato statistico delle analisi di correlazione e di regressione (correlazione/associazione diretta/inversa), nel testo abbiamo considerato GLS in valore assoluto. I valori standard sono stati mantenuti per i grafici di correlazione.

Tutte le elaborazioni sono state eseguite con software statistico computerizzato dedicato (Medcalc 12.7; Medcalc Software 2013, Belgium).<sup>144 - 145</sup>

### 3.6 CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE DI STUDIO

**Tabella 1 - Caratteristiche generali**

	<b>MEDIA</b>	<b>95% CI</b>
<b>ETA' (anni)</b>	78,39	76,353 - 80,435
<b>BSA (Mosteller;m<sup>2</sup>)</b>	1,81	1,768 - 1,857
<b>Log EUROSCORE %</b>	11,173	8,513 - 13,833
<b>EUROSCORE II %</b>	3,493	2,717 - 4,270
<b>PAS (mmHg)</b>	137,152	132,348 - 141,955
<b>PAD (mmHg)</b>	71,288	68,614 - 73,962
<b>FC (bpm)</b>	76,273	73,175 - 79,370

**Tabella 2 - Caratteristiche cliniche**

	<b>NUMERO</b>	<b>%</b>
<b>Coronaropatia (<math>\leq 50\%</math> stenosi epicardiche)</b>	29	44
<b>BPCO</b>	16	24
<b>Anemia</b>	18	27,2
<b>Malattia Renale Cronica</b>	42	63,6
<b>Fibrillazione Atriale</b>	10	15
<b>Diabete mellito</b>	16	24
<b>Ipertensione Arteriosa</b>	57	86,3
<b>Dislipidemia</b>	46	70

**Tabella 3 - Terapia farmacologica in atto**

	<b>NUMERO</b>	<b>%</b>
<b>ACE inibitori</b>	29	44
<b>AT-II inibitori</b>	15	23
<b>Anti-aldosteronici</b>	6	9
<b>Diuretici</b>	34	52
<b>Calcio-antagonisti</b>	11	17

**Tabella 4 - Dati laboratoristici**

	<b>MEDIA</b>	<b>95% CI</b>
<b>GFR (ml/min/1,73 m<sup>2</sup>)</b>	63,215	56,763 - 69,688
<b>BNP (pg/ml)</b>	250,97	220,477 - 281,463
<b>miRNA-21</b>	5,604	4,055 - 7,152

**Tabella 5 - Parametri severità valvulopatia**

	<b>MEDIA</b>	<b>95% CI</b>
<b>AVAi (cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>)</b>	0,349	0,325 - 0,373
<b>G max (mmHg)</b>	78,899	74,891 - 82,907
<b>G med (mmHg)</b>	48,143	45,488 - 50,797
<b>Peak to peak (mmHg)</b>	58,484	52,506 - 64,416
<b>V-Ratio</b>	0,198	0,186 - 0,211
<b>Vmax (m/sec)</b>	4,421	4,309 - 4,533

*AVAi*, indexed aortic valve area; *Gmax*, maximum gradient; *Gmed*, mean gradient; *Peak to peak*, Peak to peak gradient, *V-Ratio*, aortic velocity ratio; *V max*, maximum velocity.

**Tabella 6 - Indici emodinamici non invasivi**

	<b>MEDIA</b>	<b>95% CI</b>
<b>SV VTii (ml/m<sup>2</sup>)</b>	36,244	33,556 - 38,931
<b>Z<sub>VA</sub> VTI (mmHg/ml/m<sup>2</sup>)</b>	5,183	4,860 - 5,505

*SV VTii*, indexed stroke volume; *ZVA*, valvulo-arterial impedance.

**Tabella 7 - indici di funzione diastolica**

	<b>MEDIA</b>	<b>95% CI</b>
<b>EDPi (mmHg)</b>	17,477	15,631 - 19,323
<b>LAVi(ml/m<sup>2</sup>)</b>	45,6	41,781 - 49,420
<b>E/A</b>	0,84	0,727 - 0,942
<b>E/E' Average</b>	17,290	15,366 - 19,214
<b>DT (msec)</b>	221,823	203,141 - 240,504

*EDPi*, invasive left ventricular end-diastolic pressure; *LAVi*, indexed left atrial volume; *E/A*, ratio of early to late diastolic mitral filling velocity; *E/E'*, ratio of early diastolic velocity (PW) to tissue proto-diastolic velocity (TDI); *DT*, deceleration time.

**Tabella 8** - indici di funzionalità sistolica convenzionali, TDI e 2D-STI

	<b>MEDIA</b>	<b>95% CI</b>
<b>EF%</b>	60,544	57,155 - 63,934
<b>FS</b>	0,319	0,292 - 0,345
<b>S'l (cm/s)</b>	6,656	6,191 - 7,121
<b>S's(cm/s)</b>	5,741	5,358 - 6,124
<b>GLS%</b>	13,858	13,018 - 14,699

**EF** ejection fraction; **FS**, fractional shortening; **S'l**, systolic velocity (TDI) lateral; **S's**, systolic velocity (TDI) septal; **GLS**, global longitudinal strain.

**Tabella 9** - Indici dimensionali, di rimodellamento ventricolare sinistro e funzione ventricolare destra

	<b>MEDIA</b>	<b>95% CI</b>
<b>LVMi (g/m<sup>2</sup>)</b>	135,265	128,636 - 141,895
<b>SIVd (mm)</b>	13,455	13,041 - 13,869
<b>RWT</b>	0,504	0,482 - 0,526
<b>PAPs (mmHg)</b>	32,254	29,831 - 34,677
<b>TAPSE (mm)</b>	20,171	18,892 - 21,451

**LVMi**, indexed left ventricular mass; **IVSd**, diastolic interventricular septal wall thickness; **RWT**, relative wall thickness; **PAPs**, systolic pulmonary arterial pressure; **TAPSE**, tricuspid annular plane systolic excursion.

**Tabella 10** - Criteri di esclusione

Instabilità clinica
Gravidanza in atto
Scadente finestra acustica
Steno/insufficienza valvolare associata di significativa entità (criteri ecocardiografici)
Eziologia reumatica/non calcifico-degenerativa
Presenza di elettro-stimolatori/blocco di branca sinistra
Pregressa valvuloplastica aortica
Comorbidità di rilievo (nefropatia cronica in terapia emodialitica; neoplasie attive; cachessia)



**Tabella 11** - parametri ecocardiografici e laboratoristici gruppo 1 (NFLG)

	<b>MEDIANA</b>	<b>25 – 75 P</b>
<b>Vmax (m/s)</b>	4,00	3,795 - 4,075
<b>Gmed (mmHg)</b>	36,50	32,900 - 38,000
<b>AVAi (cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>)</b>	0,40	0,340 - 0,454
<b>LVMi (g/m<sup>2</sup>)</b>	153,75	113,753 - 160,000
<b>FE%</b>	64,08	55,632 - 74,439
<b>SVi (ml/m<sup>2</sup>)</b>	37,99	36,105 - 41,335
<b>ZVAi(mmHg/ml/m<sup>2</sup>)</b>	4,82	4,428 - 5,234
<b>GLS%</b>	14,90	12,100 - 17,600
<b>miRNA-21</b>	2,43	1,287 - 2,660

**Tabella 12** - parametri ecocardiografici e laboratoristici gruppo 2 (NFHG)

	<b>MEDIANA</b>	<b>25 – 75 P</b>
<b>Vmax (m/s)</b>	4,5	4,345 - 4,690
<b>Gmed (mmHg)</b>	50	46,875 - 56,250
<b>AVAi (cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>)</b>	0,374	0,365 - 0,419
<b>LVMi (g/m<sup>2</sup>)</b>	128,034	102,924 - 154,682
<b>FE%</b>	70,115	65,285 - 78,310
<b>SVi (ml/m<sup>2</sup>)</b>	42,494	37,581 - 49,106
<b>ZVAi(mmHg/ml/m<sup>2</sup>)</b>	4,328	3,572 - 4,751
<b>GLS%</b>	16,4	14,625 - 17,050
<b>miRNA-21</b>	1,858	1,417 - 5,070

**Tabella 13** - parametri ecocardiografici e laboratoristici gruppo 3 (LFHG)

	<b>MEDIANA</b>	<b>25 – 75 P</b>
<b>Vmax (m/s)</b>	4,42	4,267 - 4,800
<b>Gmed (mmHg)</b>	46,00	43,000 - 57,750
<b>AVAi (cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>)</b>	0,28	0,234 - 0,382
<b>LVMi (g/m<sup>2</sup>)</b>	128,97	108,763 - 146,339
<b>FE%</b>	61,67	58,906 - 68,266
<b>SVi (ml/m<sup>2</sup>)</b>	30,92	25,629 - 32,758
<b>ZVAi(mmHg/ml/m<sup>2</sup>)</b>	5,67	4,717 - 6,064
<b>GLS%</b>	14,30	11,025 - 17,000
<b>miRNA-21</b>	4,16	1,765 - 9,763

**Tabella 14** - parametri ecocardiografici e laboratoristici gruppo 4 (LFLG,FE%>50)

	<b>MEDIANA</b>	<b>25 – 75 P</b>
<b>Vmax (m/s)</b>	4,1	4,025 - 4,100
<b>Gmed (mmHg)</b>	37	37,000 - 38,650
<b>AVAi (cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>)</b>	0,347	0,259 - 0,358
<b>LVMi (g/m<sup>2</sup>)</b>	125,68	117,094 - 126,458
<b>FE%</b>	56	54,979 - 63,688
<b>SVi (ml/m<sup>2</sup>)</b>	27,023	26,196 - 30,155
<b>ZVAi(mmHg/ml/m<sup>2</sup>)</b>	6,18	5,365 - 7,245
<b>GLS%</b>	11	8,750 - 14,375
<b>miRNA-21</b>	6,453	4,586 - 8,319

**Tabella 15** - parametri ecocardiografici e laboratoristici gruppo 5 (LFLG,FE%<50)

	<b>MEDIANA</b>	<b>25 – 75 P</b>
<b>Vmax (m/s)</b>	4,46	4,000 - 4,880
<b>Gmed (mmHg)</b>	48,00	39,580 - 57,500
<b>AVAi (cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>)</b>	0,32	0,239 - 0,391
<b>LVMi (g/m<sup>2</sup>)</b>	149,97	135,583 - 176,265
<b>FE%</b>	43,70	39,474 - 48,571
<b>SVi (ml/m<sup>2</sup>)</b>	28,59	24,481 - 31,360
<b>ZVAi(mmHg/ml/m<sup>2</sup>)</b>	5,97	4,773 - 6,895
<b>GLS%</b>	11,25	10,800 - 12,100
<b>miRNA-21</b>	3,45	1,401 - 13,025

## 4.RISULTATI

### 4.1 RISULTATI ECOCARDIOGRAFIA CONVENZIONALE E 2D-STI

In linea con le casistiche esistenti in letteratura, i pazienti con stenosi valvolare aortica severa (AVAi  $0.349 \text{ cm}^2/\text{m}^2$ ; Vmax  $4.42 \text{ m/s}$ ; Gmax  $78,9 \text{ mmHg}$ ; Gmed  $48,14 \text{ mmHg}$ ; Peak-to-Peak  $58.48 \text{ mmHg}$ ; V-R  $0.198$ ) hanno presentato:

- valori di massa ventricolare sinistra indicizzata ( $LVMi$ ) incrementati:  $135,265 \text{ g/m}^2$  (cut-off per ipertrofia  $>115 \text{ g/m}^2$  ♂;  $95 \text{ g/m}^2$  ♀);
- ipertrofia ventricolare sinistra di tipo concentrico nella totalità dei casi valutati: RWT  $0.504$  (cut-off  $>0.42$ ).

Per quanto concerne gli indici convenzionali di funzione diastolica ventricolare sinistra, i pazienti hanno mostrato:

- disfunzione diastolica (E/A  $0.82$ ; DT  $221,82 \text{ m/s}$ );
- tendenziale incremento delle pressioni di riempimento ventricolari sinistre: E/E'  $17,29$  (cut-off  $15$ );
- dilatazione atriale sinistra, con volume atriale sinistro indicizzato (LAVi):  $45,6 \text{ ml/m}^2$  (cut-off  $34 \text{ ml/m}^2$ ).

Per quanto concerne gli indici convenzionali di funzione sistolica ventricolare sinistra, i pazienti hanno mostrato:

- frazione di eiezione ventricolare sinistra (Simpson/Teicholz) preservata:  $60,5\%$  (v.n. FE  $>50/55\%$ );
- frazione di accorciamento ventricolare sinistro nei limiti:  $31\%$  (v.n.  $>28\%$ ).

In accordo con i dati già esistenti in letteratura, una stima della funzione sistolica, in particolare della componente longitudinale, mediante indici più sensibili (TDI; 2D-STI) ha invece rilevato una significativa riduzione dei principali parametri valutati:

- S's:  $5,7 \text{ cm/s}$  (v.n.  $8 \text{ cm/s}$ )
- S'l:  $6,6 \text{ cm/s}$  (v.n.  $10 \text{ cm/s}$ )
- GLS:  $-13,8\%$  (v.n.  $>-18.6\%$ )

Sono inoltre stati riscontrati elevati valori d'impedenza valvulo-arteriosa:

- Zva: 5.18 mmHg/ml/m<sup>2</sup> (v.n.<3.5 mmHg/ml/m<sup>2</sup>).

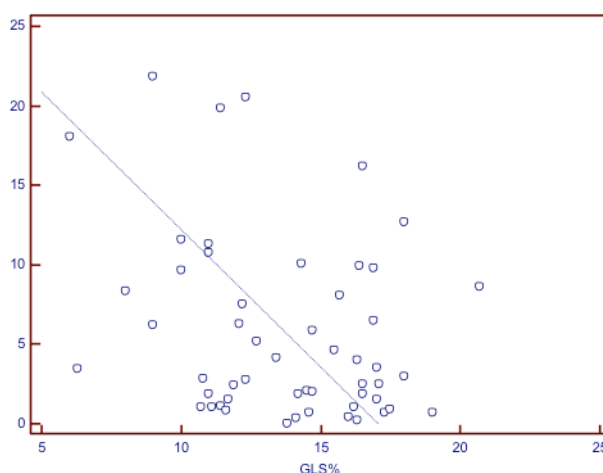
Mediante Analisi di correlazione è emersa:

- la presenza di una correlazione diretta tra GLS e SV-VTi: (r=0.31; p=0.01);
- una correlazione inversa tra LVMi, Z<sub>VA</sub> e GLS: rispettivamente (r=-0.35; p=0.004); (r=-0.40; p= 0.01).

## 4.2 RISULTATI CAMPIONI EMATICI

E' emersa una correlazione inversa tra livelli di espressione relativa del miRNA-21 plasmatico e il GLS: (r=-0.28; p=0.03).

In analisi multivariata esiste un'associazione tra GLS e miRNA-21, anche dopo correzione per età e sesso (p=0.048).

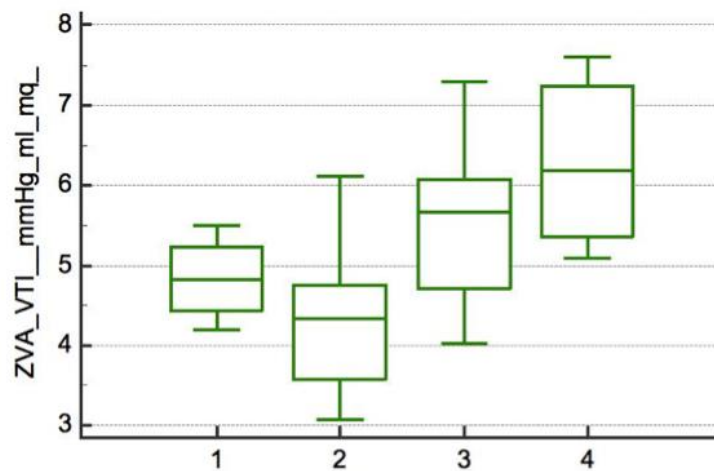


**Figura 27:** diagramma di dispersione (Correlation Plot) GLS/miRNA-21.

## 4.3 EVIDENZE RISULTATI IN RIFERIMENTO ALLA CLASSIFICAZIONE FLUSSO-GRADIENTE

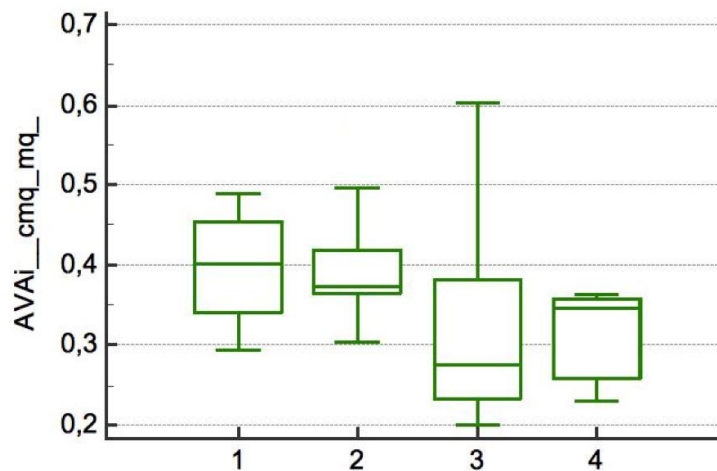
Suddividendo la popolazione di pazienti con stenosi valvolare aortica severa (AVA <0,6cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>) e frazione di eiezione preservata (FE>50%) in quattro classi 1) Normal Flow/Low Gradient; 2) Normal Flow/High Gradient; 3) Low Flow/High Gradient; 4) Low Flow/Low Gradient, in base al gradiente medio (>/< 40 mmHg) ed allo stroke volume indicizzato per la superficie corporea (>/< 35 ml/m<sup>2</sup>), sono emersi:

- valori di Zva più elevati nei gruppi 3 e 4, con una progressione positiva dal gruppo 1 al gruppo 4 ( $p=0,001$ );



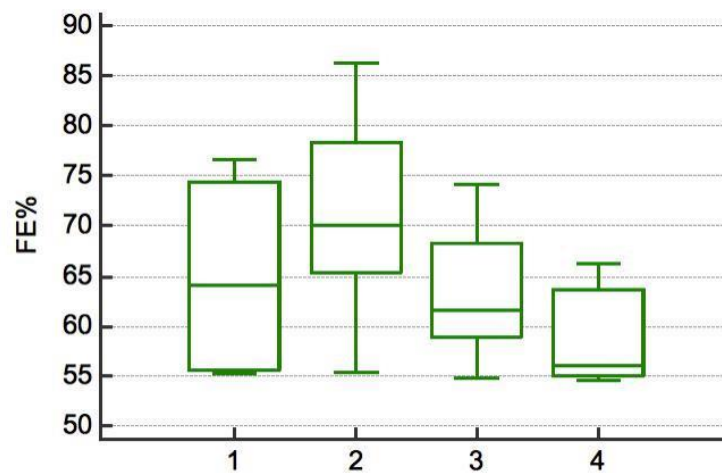
**Figura 28:** differenti livelli di Zva nei 4 gruppi flusso-gradiente. Si notano livelli più alti nei gruppi 3 (media 5,546 mmHg/ml/m<sup>2</sup>; 95% IC 5,178 – 5,913mmHg/ml/m<sup>2</sup>) e 4 (media 6,291 mmHg/ml/m<sup>2</sup>; 95% IC 5,169 – 9,413 mmHg/ml/m<sup>2</sup>).

- valori di AVAi più bassi nel gruppo 3 ( $p=0,02$ );



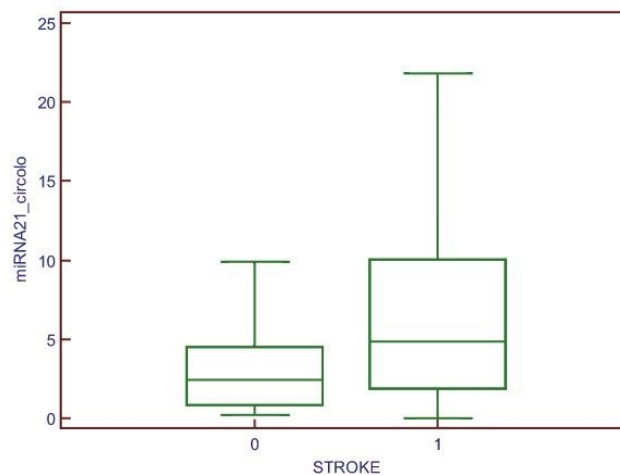
**Figura 29:** differenti livelli di AVAi nei 4 gruppi flusso-gradiente. Si nota il livello più basso nel gruppo 3 (media 0,276 cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>; 95% IC 0,243 - 0,348 cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>).

- valori di FE più bassi nel gruppo 4 ( $p=0,017$ );



**Figura 30:** Differenti livelli di FE nei 4 gruppi flusso-gradiente. Si nota il livello più basso di FE nel gruppo 4 (media 58,963%; 95% IC 43,196 – 74,731%).

- valori di miRNA-21 plasmatici più elevati nei gruppi a basso flusso ( $SV_i < 35 \text{ ml/m}^2$ ) ( $p=0,03$ );



**Figura 31:** Differenti livelli di miRNA-21 nei gruppi a basso e alto flusso. Si notano livelli più alti di miRNA-21 nei gruppi a basso flusso.

- un trend, non statisticamente significativo, di valori del GLS più bassi nei gruppi a basso flusso ( $SV_i < 35 \text{ ml/m}^2$ ).

## 5.DISCUSSIONE

La Stenosi Valvolare Aortica (SVA) calcifica-degenerativa rappresenta la più frequente patologia valvolare nei paesi occidentali, soprattutto nei pazienti anziani.<sup>146</sup>

A seguito della progressiva ostruzione al passaggio di sangue dal ventricolo sinistro all'aorta, per mantenere un adeguato flusso attraverso l'area valvolare stenotica, si sviluppa un sovraccarico pressorio ventricolare che a sua volta induce alterazioni fisiopatologiche come ipertrofia concentrica e progressiva fibrosi miocardica.<sup>147</sup>

In particolare, nel processo ipertrofico che accompagna il sovraccarico pressorio, oltre alle alterazioni a carico dei miocardiociti, si assiste al rimodellamento strutturale e biochimico dell'interstizio cardiaco, principalmente promosso da un alterato comportamento dei fibroblasti. Il rimodellamento della matrice extracellulare attraverso la deposizione di collagene è una manifestazione patologica precoce, spesso non reversibile, e rappresenta un fattore centrale nella progressione della patologia. La deposizione di collagene esita in un quadro di fibrosi che comporta un'aumentata rigidità e favorisce la disfunzione miocardica, portando quindi allo scompenso.<sup>32 - 33 - 148</sup>

È noto come la fibrosi nella SVA severa contribuisca ad alterazioni della funzione ventricolare con aggravamento della prognosi e della qualità di vita del paziente anche in seguito alla sostituzione valvolare.<sup>29</sup>

Per la valutazione e quantificazione della fibrosi, la biopsia endomiocardica è considerata il gold-standard, tuttavia è una metodica invasiva e non esente da rischi.

Le moderne tecniche d'imaging stimano la fibrosi in modo non invasivo con buona correlazione con i dati istologici. Tali metodiche permettono di visualizzare *direttamente* la fibrosi o consentono di valutare la disfunzione sisto-diastolica sub-clinica e *indirettamente* lo stato di fibrosi.<sup>149 - 150</sup>

La risonanza magnetica cardiaca è la metodica d'imaging non invasiva di riferimento per la quantizzazione diretta della fibrosi focale, tuttavia i limiti sono connessi alla disponibilità e agli alti costi dell'esame oltre che all'utilizzo del mezzo di contrasto.

Altre tecniche d'imaging ecocardiografiche garantiscono una valutazione indiretta della fibrosi, attraverso lo studio delle alterazioni di funzionalità ventricolare da essa indotte.

Metodiche sensibili per la valutazione della disfunzione longitudinale, quali lo studio del Mitral Annular Plane Systolic Excurtion (MAPSE) o il Tissue Doppler Imaging (TDI), possono consentire di rilevare iniziali alterazioni della contrattilità ma non permettono

un'adeguata stratificazione di rischio dei pazienti a causa di alcune limitazioni quali la monodimensionalità, l'angolo-dipendenza e un'elevata variabilità intra ed inter-operatore.

Recenti progressi in ecocardiografia, come l'introduzione dello Speckle Tracking Imaging (2D-STI), superano questi limiti e consentono di stimare in modo rapido, non invasivo, riproducibile, multi-direzionale e angolo-indipendente, i sottili cambiamenti della meccanica cardiaca e della deformazione miocardica che caratterizzano questi pazienti fin dalle fasi precoci.<sup>151</sup>

In diversi lavori, gli indici di deformazione miocardica, e in particolare l'indice di deformazione longitudinale globale (Global Longitudinal Strain, GLS), hanno mostrato un'affidabilità sia diagnostica che prognostica rilevanti, permettendo una migliore stratificazione dei pazienti con SVA.<sup>152 - 153</sup>

Inoltre, in recenti studi su pazienti con SVA e cardiomiopatia ipertrofica, il GLS presenta una correlazione con la fibrosi miocardica valutata mediante risonanza magnetica cardiaca con T1 mapping.<sup>154 - 155</sup>

Nel presente lavoro sono stati studiati 66 pazienti con SVA severa e sintomatica, candidati ad intervento di sostituzione valvolare aortica chirurgica o percutanea. In linea con la letteratura, questi pazienti presentavano un aumento del post-carico globale, un incremento della massa ventricolare sinistra con ipertrofia concentrica e un grado variabile di disfunzione diastolica. Una stima della funzione sistolica tramite TDI ha mostrato una netta compromissione della funzione longitudinale, a testimonianza di una funzionalità ventricolare compromessa anche nei pazienti con FE preservata.

In tutti i pazienti analizzati è stata osservata una riduzione significativa dei parametri di deformazione miocardica valutati con 2D-STI.

Inoltre, è stato notato come il GLS risultava inversamente correlato con gli indici di post-carico (Zva) e con i parametri di rimodellamento ventricolare (LVMi), confermando i risultati di ricerche precedenti.

In aggiunta, è stata riscontrata un'associazione significativa del GLS con lo SVi, un indice importante per la classificazione e la gestione dei pazienti con SVA.

Poiché il decadimento progressivo della funzionalità ventricolare è correlato alla progressiva ipertrofia miocardica e alla fibrosi che si sviluppa nel decorso della patologia sino ad arrivare ad uno stadio d'insufficienza cardiaca irreversibile, la valutazione della deformazione miocardica mediante 2D-STI gioca un ruolo importante nell'individuare alterazioni meccaniche indotte dalla fibrosi. Il potenziale beneficio ottenuto, oltre a definire le



alterazioni sistoliche, deriva da una migliore e precoce identificazione dei processi di rimodellamento tissutale, in modo tale da individuare i pazienti a rischio di disfunzione miocardica e avviarli precocemente alla terapia.

In questo modo si pone attenzione non solo agli indici valvolari o flusso-dipendenti (parametri di riferimento attuali per stimare la severità della stenosi e l'indicazione all'intervento chirurgico), ma anche al miocardio e alle sue alterazioni, per ottimizzare la gestione e il trattamento dei pazienti.

I microRNA (miRNA) hanno un ruolo cruciale nella regolazione d'importanti processi fisiologici e patologici in diversi apparati, compreso anche quello cardiovascolare.<sup>156</sup>

I miRNA sono molecole di RNA a singolo filamento della lunghezza approssimativa di 22 nucleotidi che regolano negativamente l'espressione di geni target. Il silenziamento può avvenire sia tramite degradazione del mRNA, qualora ci sia sovrapposizione completa tra il miRNA e il messaggero bersaglio, altrimenti tramite blocco della traduzione.<sup>72 - 73 - 157</sup>

I miRNA quindi esercitano una regolazione genica molto efficace e sensibile, sia singolarmente che in gruppo (rete di miRNA). Inoltre, dal momento che i geni che codificano per i miRNA sono molto meno numerosi di quelli per le proteine; ne consegue che un potenziale miRNA è capace di silenziare molti geni bersaglio.

Una peculiarità dei miRNA è quella di poter entrare in circolo mediante microvescicole (esosomi) in forma estremamente stabile, consentendo così una loro quantificazione mediante prelievo plasmatico.<sup>75 - 76 - 158</sup>

Dati recenti hanno evidenziato il ruolo regolatore dei miRNA sia tissutali che plasmatici nel contesto di numerose patologie cardiovascolari. Poiché il pattern di espressione dei miRNA varia in base al tipo di patologia cardiaca, si ritiene che il loro profilo di espressione possa essere usato come potenziale biomarcatore per la diagnosi, la prognosi e la risposta terapeutica.<sup>77</sup>

Rispetto ai biomarcatori attualmente in uso, sostanzialmente proteine, i miRNA presentano diversi vantaggi:

- risultano altamente stabili nei fluidi corporei, poiché protetti dal clivaggio delle nucleasi inserendosi all'interno di microvescicole o complessi proteici;
- le moderne tecnologie di sequenziamento consentono una rapida e accurata misurazione dei livelli plasmatici di miRNA e la loro identificazione non richiede lo sviluppo di nuove tecniche diagnostiche;

- grazie alle moderne tecniche di amplificazione genica (PCR) è possibile misurare livelli molto bassi di miRNA in volumi ridotti di fluidi corporei.<sup>97</sup>

In sostanza, la stabilità e la diversità dei miRNA, in combinazione con le tecniche a disposizione li rende dei nuovi e promettenti biomarcatori diagnostici.<sup>159 - 160</sup>

Tuttavia, i miRNA presentano anche alcuni limiti: una bassa correlazione tra studi diversi sui miRNA da considerare specifici per specifiche patologie e l'assenza di protocolli di laboratorio standardizzati per l'estrazione, il dosaggio e la normalizzazione dell'analisi.<sup>98 - 161</sup>

Per quanto riguarda la fibrosi miocardica, sono stati identificati un certo numero di miRNA in grado di regolare questo fenomeno.

In particolare il miRNA-21 ha dimostrato di avere un potenziale ruolo nella fibrogenesi TGF- $\beta$  mediata, in cuori sottoposti a sovraccarico pressorio.

Si nota come l'iperespressione tissutale del miRNA-21, in risposta ad un insulto cardiaco, sia prevalentemente limitata ai fibroblasti cardiaci promuovendo la proliferazione, trans-differenziazione e la protezione dall'apoptosi, oltre che lo sviluppo di fibrosi favorendo la deposizione di collagene e riducendone la degradazione.<sup>162</sup>

Inoltre, è stato riscontrato l'importante ruolo del miRNA-21 nel rimodellamento miocardico secondario a SVA. I livelli miocardici e plasmatici del miRNA-21 risultano molto più alti nei pazienti con stenosi aortica rispetto ai controlli e correlano con il gradiente trans-valvolare aortico, suggerendo un legame tra la severità della patologia e l'iperespressione dei miRNA-21. Oltre a questo, è stato dimostrato come i livelli di miRNA-21 tissutale e plasmatico potessero predire la quota di fibrosi miocardica.<sup>78 - 79</sup>

Nel presente studio sono stati riscontrati livelli di miRNA-21 plasmatici elevati, in accordo con gli studi precedenti. È interessante notare come i livelli di espressione del miRNA-21 mostrino una correlazione inversa significativa con gli indici di deformazione miocardica (GLS), suggerendo una possibile associazione tra i livelli di espressione del miRNA-21 plasmatico e la fibrosi miocardica.

Pertanto l'implicazione clinica che possiamo ricavare è quella di "double pathway" ecocardiografico e biomorale (meno invasivo rispetto alla biopsia endomiocardica e meno dispendioso rispetto alla risonanza magnetica).

Dato che le alterazioni miocardiche persistono anche dopo l'approccio di sostituzione valvolare, il beneficio clinico che possiamo ricavare associando le alterazioni sistoliche precoci (2D-STI) a nuovi biomarcatori d'importanza fisiopatologica (miRNA-21), consiste

nel poter migliorare l'identificazione del processo di remodeling tissutale, prima dello sviluppo lento e silenzioso di disfunzione conclamata.<sup>163</sup>

Attualmente le indicazioni all'intervento di sostituzione valvolare (Aortic Valve Replacement, AVR) sono poste in presenza di SVA di entità severa all'insorgere di sintomi tipici o al manifestarsi di una riduzione della Frazione di Eiezione ( $FE < 50\%$ ).

Tuttavia, la comparsa di sintomi e la riduzione della FE si associano ad alterazioni della contrattilità a volte non reversibili dopo intervento. Infatti la comparsa di sintomi e la riduzione della FE identificano l'esaurirsi dei meccanismi di compenso e lo sviluppo di alterazioni tissutali miocardiche spesso non reversibili che limitano così il miglioramento della prognosi e la qualità della vita dopo la sostituzione valvolare.<sup>164 - 165</sup>

La diagnosi di SVA severa è classicamente confermata tramite parametri emodinamici che consistono in un orifizio valvolare aortico minore di  $1 \text{ cm}^2$  o minore di  $0,6 \text{ cm}^2/\text{m}^2$  se indicizzato per la superficie corporea, un gradiente medio maggiore di 40 mmHg e una velocità di picco maggiore di 4 cm/s. Nella pratica clinica, le discordanze tra questi tre parametri sono frequentemente osservate, in particolare tra il gradiente medio e l'area dell'orifizio valvolare. Queste discordanze sono facili da comprendere nei pazienti con ridotta FE e funzione sistolica compromessa, a causa della dipendenza del gradiente dal flusso; tuttavia possono comparire anche nei pazienti con FE preservata, mettendo in discussione la severità della stenosi aortica. Dato che le linee guida correnti raccomandano l'intervento chirurgico solo per i pazienti nei quali la severità sia stata confermata, questa situazione potrebbe comportare una sottostima della stenosi in una parte dei pazienti e un inappropriato ritardo all'intervento di sostituzione valvolare con conseguente impatto prognostico negativo.<sup>120</sup>

I parametri emodinamici utilizzati nella valutazione della gravità della stenosi (area valvolare, velocità di picco e gradiente pressorio trans-valvolare) hanno dimostrato di avere un importante flusso dipendenza e una limitata correlazione sia con alterazioni strutturali del miocardio, in particolare l'ipertrofia ventricolare sinistra e la fibrosi, che con la sintomatologia dei pazienti. È stato inoltre riscontrato come questi parametri riflettano solo la componente valvolare del disturbo, non prendendo in considerazione il ventricolo e l'aorta.<sup>166</sup>

La FE risulta un parametro inadeguato per la valutazione della funzione ventricolare sistolica in presenza di ipertrofia concentrica rimanendo normale per lungo tempo nonostante importanti processi di rimodellamento, e una sua riduzione si osserva in una fase relativamente tardiva di malattia.<sup>125 - 126 - 167</sup>

La FE peraltro ha dimostrato di possedere una significativa correlazione inversa solo con gli indici di post-carico mentre nessuna correlazione è emersa con la percentuale di fibrosi tissutale.<sup>168</sup>

Si nota inoltre che i pazienti con FE preservata ma gittata sistolica ridotta presentano prognosi peggiore. La riduzione della gittata sistolica (Stroke Volume index, SVi) dimostra un peggioramento della funzione contrattile di cui la fibrosi cardiaca è il principale responsabile non rilevato dal parametro di FE. In aggiunta, recenti lavori hanno sottolineato il ruolo centrale dello SVi come fattore prognostico negativo, indipendentemente dai parametri di severità della stenosi. Per tutte queste ragioni la FE risulta inappropriata per la stratificazione prognostica dei pazienti.<sup>129 - 169</sup>

L'accertamento dello stato di asintomaticità è una pratica complessa nel paziente anziano. Nella gestione dei pazienti con SVA severa è difficile attribuire con specificità i sintomi alla patologia valvolare a causa delle frequenti comorbidità.<sup>124</sup>

Per ottimizzare la gestione e il trattamento dei pazienti, è quindi necessario rivalutare i criteri diagnostici di severità e indicazioni all'intervento chirurgico, ponendo attenzione non solo agli indici emodinamici flusso-dipendenti, ma anche ad altri fattori tra cui il rimodellamento miocardico e il suo progressivo decadimento funzionale.<sup>170</sup>

Inoltre, sulla base delle conoscenze acquisite è stata proposta una nuova classificazione di stenosi aortica severa per poter meglio caratterizzare i pazienti dal punto di vista diagnostico e terapeutico, basata sui parametri di basso/alto flusso (valutato come SVi, maggiore o minore di 35 ml/min) e basso/alto gradiente pressorio trans-valvolare (valutato come gradiente pressorio medio, maggiore o minore di 40 mmHg). Quindi si delineano 4 classi di pazienti: normal-flow low-gradient (NFLG), normal-flow high-gradient (NFHG), low-flow high-gradient (LFHG) e low-flow low-gradient (LFLG). Queste 4 classi presentano differenze in termini di funzionalità sistolica, stratificazione di rischio e prognosi ingravescente dalla classe 1 alla 4. A questi quattro gruppi si aggiunge una quinta entità che comprende i pazienti che presentano una FE compromessa ( $FE < 50\%$ ).<sup>130 - 131</sup>

Nel nostro studio sono stati riscontrati:

- valori d'impedenza valvolare-arteriosa (ZVA index) più elevati nei pazienti a basso flusso (LFHG e LFLG) con una progressione positiva dal gruppo 1 (NFLG) al gruppo 4 (LFLG);
- AVAi e FE nel complesso più bassi nei gruppi a basso flusso (LFHG e LFLG);
- i livelli circolanti di miRNA-21 più alti nei gruppi a basso flusso (LFHG e LFLG);

- un trend, non statisticamente significativo, di valori di deformazione miocardica (GLS) più bassi nei gruppi a basso flusso (LFHG e LFLG).

In base a quanto suggerito dallo studio di Lancellotti, le classi di pazienti a basso flusso ed in particolare la classe LFLG, possono rappresentare uno stadio più avanzato della patologia. Infatti si associano a un rimodellamento ventricolare sinistro più pronunciato, si caratterizzano per una maggior disfunzione miocardica intrinseca, un incremento globale del post-carico ventricolare sinistro e presentano una prognosi peggiore.

Inoltre, i più alti livelli plasmatici di miRNA-21 nelle classi a basso flusso suggeriscono un grado maggiore di fibrosi miocardica in questi pazienti.

## **6.LIMITAZIONI**

La principale limitazione dello studio è il numero relativamente ridotto della popolazione. Tuttavia per il suo principale scopo (studio di correlazione) è appropriato.

L'analisi dell'espressione dei miRNA è promettente ma deve essere validata in più grandi studi. Finora anche per il limitato numero di casi collezionati, non abbiamo l'obiettivo di ricavare il cut-off dei valori plasmatici/tissutali di miRNA.

Il protocollo di laboratorio seguito per l'analisi dei livelli plasmatici dei miRNA rileva sia la componente plasmatica che cellulare del campione ematico prelevato.

## 7.CONCLUSIONI

La stenosi valvolare aortica è una malattia complessa e gli attuali parametri ecocardiografici di severità sembrano insufficienti per poterla caratterizzare nella sua interezza.

Considerate le lente ma spesso irreversibili alterazioni strutturali e ultrastrutturali che questa comporta, una strategia di attesa sino alla comparsa dei sintomi o della riduzione della frazione di eiezione può risultare inappropriata, in quanto indicativa dell'esaurimento dei meccanismi di compenso con possibile irreversibilità del quadro clinico anche dopo l'intervento chirurgico.

Perciò sarebbe opportuno porre l'attenzione non solo sugli indici valvolari o flusso-dipendenti, ma anche sul miocardio e le sue alterazioni che persistono dopo la sostituzione valvolare condizionandone la prognosi.

Lo studio associato delle alterazioni sistoliche precoci mediato dalle nuove tecniche ecocardiografiche e da nuovi biomarcatori plasmatici potrebbe permettere di identificare anticipatamente e in maniera sensibile il rimodellamento tissutale cardiaco, prima dello sviluppo di una disfunzione ventricolare evidente e dunque di migliorare la stratificazione di rischio dei pazienti con stenosi valvolare aortica e ottimizzare il timing operatorio.





## 8.BIBLIOGRAFIA

- 
- <sup>1</sup> Rahimtoola SH. Aortic valve disease. In: Fuster V, Alexander RW, O'Rourke RA, eds. *Hurt's The Heart*, 10th ed. New York, McGraw Hill; 1998, 1667-1695.
- <sup>2</sup> Bonow RO, Braunwald E. Cardiopatia valvolare. In Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E eds. *Malattie del cuore di Braunwald-Trattato di medicina cardiovascolare*. 7°ed. Milano: Elsevier. 2007, 1553-632.
- <sup>3</sup> Favilli S, Cardiopatie Congenite. In: Favilli S, Manetti A, De Simone L, eds. *Cardiologia Pediatrica*. Firenze: SSE; 1998, 137-141.
- <sup>4</sup> Braverman AC. The bicuspid aortic valve. In Otto CM, Bonow RO eds. *Valvular Heart Disease: A Companion to Braunwald's Heart Disease*. Philadelphia, Saunders/Elsevier, 2009, 169-186.
- <sup>5</sup> Guilherme L, Kalil J. Rheumatic fever: from innate to acquired immune response. *Ann NY Acad Sci* 1107:426, 2007.
- <sup>6</sup> Schoen FJ. Cardiac valves and valvular pathology. Update of function, disease. Repair, and replacement. *Cardiovascular Pathol* 14:189, 2005.
- <sup>7</sup> Helske S, Otto CM. Lipid lowering in aortic stenosis: Still some light at the end of the tunnel? *Circulation* 119:2653, 2009.
- <sup>8</sup> Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, Simmons CA, Masters KS, Mathieu P, O'Brien KD, Schoen FJ, Towler DA, Yoganathan AP, Otto CM. Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation*. 2011 Oct 18;124(16):1783-91.
- <sup>9</sup> Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, et al. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. *J Am coll Cardiol* 29:630, 1997.
- <sup>10</sup> Katz R, Wong ND, Kronmal R, et al. Features of the metabolic syndrome and diabetes mellitus as predictions of aortic valve calcification in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circulation* 113:2113-2119, 2006.
- <sup>11</sup> Frederick J, Schoen, Richard N, Mitchell. Il cuore In V Kumar, AK Abbas, N Fausto, JC Aster eds. *Robbins e Cotran Le basi patologiche delle malattie* 8°ed.
- <sup>12</sup> Guidelines on the management of valvular heart disease The Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2007;28:230-68.
- <sup>13</sup> Soler-Soler J, Galve E. Worldwide perspective of valve disease. *Heart* 2000;83(6): 721-5.

- 
- <sup>14</sup> Faggiano P, Antonini-Canterin F, Baldessin F, Lorusso R, D'Aloia A, Cas LD. Epidemiology and cardiovascular risk factors of aortic stenosis. *Cardiovasc Ultrasound* 2006; 4: 27.
- <sup>15</sup> Cleland JG, Swedberg K, Follath F, Komajda M, Cohen-Solal A, Aguilar JC, et al. The EuroHeart Failure survey programme: a survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe. Part 1: patient characteristics and diagnosis. *Eur Heart J* 2003;24(5): 442-63.
- <sup>16</sup> Iung B, Baron G, Butchart EG, et al. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: the Euro Heart Survey on valvular heart disease. *Eur Heart J* 2003;24:1231-43.
- <sup>17</sup> Gorlin R, Gorlin SG. Hydraulic formula for calculation of the area of the stenotic mitral valve, other cardiac valves, and central circulation shunts. I. *Am Heart J* 41: 1-45, 1951.
- <sup>18</sup> Baumgartner H, Hung J, Bermejo J, et al. Echocardiographic assessment of valve stenosis: EAE/ASE recommendations for clinical practice. *Eur J Echocardiograf* 10:1, 2009.
- <sup>19</sup> Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *The Journal of clinical investigation*. 1975 Jul;56(1):56-64.
- <sup>20</sup> Pantely G, Morton MJ, Rahimtoola SH. Effects of successful, uncomplicated AVR on ventricular hypertrophy, volume and performance in aortic stenosis and aortic incompetence. *J Thorac Cardiovascular Surg* 1978; 75:383-391.
- <sup>21</sup> Lanza G, Satolli R, Crea F. *Scompenso Cardiaco*. In: Rugarli editor. *Medicina Interna Sistemica*. 6°ed. Milano: Elsevier 2010. p275-310.
- <sup>22</sup> Hess OM, Villari B, Krayernbuehl HP. Diastolic dysfunction in aortic stenosis. *Circulation* 1993; 87(suppl IV):73-76.
- <sup>23</sup> Stott DK, Marpole DGF, Bristow JD, et al. The role of LA transport in aortic and mitral stenosis. *Circulation* 1970; 41:1031-1041.
- <sup>24</sup> Marcus ML, Doty DB, Horatzka LF, et al. Decreased coronary reserve: A mechanism for angina pectoris in patients with aortic stenosis and normal coronary arteries. *NEJM* 1982; 307:1362-1366.
- <sup>25</sup> Lanza G, Lombardo A, Satolli R, Schweiger C. *Malattie Valvolari*. In: Rugarli editor. *Medicina Interna Sistemica*. 6°ed. Milano: Elsevier 2010. p162-166.
- <sup>26</sup> Krayernbuehl HP, Hess OM, Ritter M, Monrad ES, Hoppeler H. Left ventricular systolic function in aortic stenosis. *European heart journal*. 1988 Apr; 9 Suppl E:19-23.
- <sup>27</sup> MacGregor DC, Covell JW, Mahler F, Dilly RB, Ross J Jr. Relations between afterload, stroke volume, and descending limb of Starling's curve. *Am J Physiol* 1974; 227:884-90.
- <sup>28</sup> Ross J Jr. Afterload mismatch in aortic and mitral valve disease: implications for surgical

---

therapy. *J Am Coll Cardiol*. 1985; 5(4):811-826.

<sup>29</sup> Hein S, Arnon E, Kostin S, Schonburg M, Elsasser A, Polyakova V, et al. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation*. 2003 Feb 25;107(7):984-91.

<sup>30</sup> Monrad ES, Hess OM, Murakami T, Nonogi H, Corin WJ, Krayenbuehl HP. Time course of regression of left ventricular hypertrophy after aortic valve replacement. *Circulation*. 1988Jun;77(6):1345-55.

<sup>31</sup> Villari B, Vassalli G, Monrad ES, Chiariello M, Turina M, Hess OM. Normalization of diastolic dysfunction in aortic stenosis late after valve replacement. *Circulation*. 1995 May 1;91(9):2353-8.

<sup>32</sup> Weidemann F, Herrmann S, Stork S, Niemann M, Frantz S, Lange V, et al. Impact of myocardial fibrosis in patients with symptomatic severe aortic stenosis. *Circulation*. 2009 Aug 18;120(7):577-84.

<sup>33</sup> Sugihara N, Genda A, Shimizu M, Suematsu T, Kita Y, Minamoto M, et al. Diastolic dysfunction and its relation to myocardial fibrosis in essential hypertension. *Journal of cardiology*. 1998 Jun; 18(2):353-61.

<sup>34</sup> Nazarian S. Is ventricular arrhythmia a possible mediator of the association between aortic stenosis-related midwall fibrosis and mortality? *Journal of the American College of Cardiology*. 2011 Sep 13;58(12):1280-2.

<sup>35</sup> Weber KT, Janicki JS, Shroff SG, Pick R, Chen RM, Bashey RI. Collagen remodelling of the pressure overload, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Circ Res*, 62: 757-765, 1988.

<sup>36</sup> Monfort I, Perez-Tamayo R. The muscle collagen ratio in normal and hypertrophic human heart. *Lab Invest*, 11: 463-470, 1962.

<sup>37</sup> Weber KT, Eghbali M. Collagen matrix synthesis and degradation in the development and regression of left ventricular hypertrophy. *Cardiovasc Rev Rep*, 12: 61-69, 1991.

<sup>38</sup> Rossi MA. Connective tissue skeleton in the normal left ventricle and in hypertensive left ventricular hypertrophy and chronic chagasis myocarditis. *Med Sci Monit*, 7 (4): 820-832, 2001.

<sup>39</sup> Weber KT. Angiotensin II and connective tissue: homeostasis and reciprocal regulation. *Regulatory peptides*. 1999 Jun 30;82(1-3):1-17.

<sup>40</sup> Schultz Jel J, Witt SA, Glascock BJ, Nieman ML, Reiser PJ, Nix SL, et al. TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *The Journal of clinical investigation*. 2002 Mar;109(6):787-96.

<sup>41</sup> Heymans S, Schroen B, Vermeersch P, Milting H, Gao F, Kassner A, et al. Increased cardiac expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of

---

metalloproteinase-2 is related to cardiac fibrosis and dysfunction in the chronic pressure-overloaded human heart. *Circulation*. 2005 Aug 23;112(8):1136-44.

<sup>42</sup> Wang J, Chen H, Seth A, McCulloch CA. Mechanical force regulation of myofibroblast differentiation in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 285:H1871-1881.

<sup>43</sup> Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2010; 48:504-511.

<sup>44</sup> Wynn TA, Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis*. 2010; 30:245-257.

<sup>45</sup> Levi-Schaffer F, Rubinchik E. Mast cell/fibroblast interactions. *Clin Exp Allergy*. 1994; 24:1016-1021.

<sup>46</sup> Zhao XY, Zhao LY, Zheng QS, Su JL, Guan H, Shang FJ, Niu XL, He YP, Lu XL. Chymase induces profibrotic response via transforming growth factor-beta 1/Smad activation in rat cardiac fibroblasts. *Mol Cell Biochem*. 2008; 310:159-166.

<sup>47</sup> Barron L, Wynn TA. Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011; 300:G723-728.

<sup>48</sup> Adiarto S, Heiden S, Vignon-Zellweger N, Nakayama K, Yagi K, Yanagisawa M, Emoto N. ET-1 from endothelial cells is required for complete angiotensin II-induced cardiac fibrosis and hypertrophy. *Life Sci*. 2012; 91:651-657.

<sup>49</sup> Dolmatova E, Spagnol G, Boassa D, Baum JR, Keith K, Ambrosi C, Kontaridis MI, Sorgen PL, Sosinsky GE, Duffy HS. Cardiomyocyte ATP release through pannexin 1 aids in early fibroblast activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012; 303:H1208-1218.

<sup>50</sup> Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The Pathogenesis of Cardiac Fibrosis. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Feb. 71(4):549-74.

<sup>51</sup> Rybarczyk BJ, Lawrence SO, Simpson-Haidaris PJ. Matrix-fibrinogen enhances wound closure by increasing both cell proliferation and migration. *Blood*. 2003; 102:4035-4043.

<sup>52</sup> Greiling D, Clark RA. Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. *J Cell Sci*. 1997; 110(Pt 7):861-870.

<sup>53</sup> Gould KL, Carabello BA. Why angina in aortic stenosis with normal coronary arteriograms? *Circulation*. 2003; 107(25): 3121-3.

<sup>54</sup> Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS. Harrison. Principi di medicina interna. 16° ed. Milano: McGraw-Hill Companies, 2004.

<sup>55</sup> Sadler JE. Aortic Stenosis, von Willebrand factor, and bleeding. *NEJM* 2003; 349:323-325.

- 
- <sup>56</sup> Ross J, Braunwald E. Aortic Stenosis. *Circulation* 1968 Jul;38(1 Suppl):61-7. Review. 1968 Jul;38(1 Suppl):61-7.
- <sup>57</sup> Thompson R, Mitchell A, Ahmed M, et al. Conduction defects in aortic valve disease. *AM Heart J* 1979; 98:3-10.
- <sup>58</sup> Giovanni Corrado, Giovanni Foglia-Manzillo, Luca Sormani e Mauro Santarone. Valutazione ecocardiografica delle dimensioni e della funzione sistolica globale del ventricolo sinistro. *Giornale italiano di ecografia cardiovascolare*. Giugno 2006.
- <sup>59</sup> Kotlewski A, Kawanishi DT, McKay CR, et al. The relative value of clinical examination, echocardiography with Doppler and cardiac catheterization with angiography in the evaluation of aortic valve disease. In Bodnar E, ed. *Surgery of Heart Valve Disease*. London: ICR; 1990:66-72.
- <sup>60</sup> Zoghbi WA, Farmer KL, Soto JG, Nelson JG, Quinones MA. Accurate noninvasive quantification of stenotic aortic valve area by Doppler echocardiography. *Circulation*. 1986; 73(3): 452-9.
- <sup>61</sup> Cawley PJ, Maki JH, Otto CM. Cardiovascular magnetic resonance imaging for valvular heart disease: Technique and validation. *Circulation* 119:468, 2009.
- <sup>62</sup> Mullany CJ, Elveback ER, Frye RL, et al. Coronary artery disease and its management: Influence on survival in patients undergoing AVR. *JACC* 1987; 10:66-72.
- <sup>63</sup> Mimbs JW, O'Donnell M, Bauwens D, Miller JW, Sobel BE. The dependence of ultrasonic attenuation and backscatter on collagen content in dog and rabbit hearts. *Circulation research*. 1980 Jul;47(1):49-58.
- <sup>64</sup> Rudolph A, Abdel-Aty H, Bohl S, Boye P, Zagrosek A, Dietz R, et al. Noninvasive detection of fibrosis applying contrast-enhanced cardiac magnetic resonance in different forms of left ventricular hypertrophy relation to remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009 Jan 20;53(3):284-91.
- <sup>65</sup> CL Jellis, DH Kwon. Myocardial T1 mapping: modalities and clinical applications *Cardiovasc Diagn Ther*. 2014 Apr; 4(2): 126-137.
- <sup>66</sup> Peterson KL. Severe calcific aortic stenosis left ventricular afterload and its quantification. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005 Jul 19;46(2):299-301.
- <sup>67</sup> Amundsen BH, Helle-Valle T, Edvardsen T, Torp H, Crosby J, Lyseggen E, et al. Noninvasive myocardial strain measurement by speckle tracking echocardiography: validation against sonomicrometry and tagged magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Feb 21;47(4):789-93.
- <sup>68</sup> Popovic ZB, Kwon DH, Mishra M, Buakhamsri A, Greenberg NL, Thamilarasan M, et al. Association between regional ventricular function and myocardial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy assessed by speckle tracking echocardiography and delayed hyper

---

enhancement magnetic resonance imaging. *Journal of the American Society of Echocardiography: official publication of the American Society of Echocardiography*. 2008 Dec;21(12):1299-305.

<sup>69</sup> Martos R, Baugh J, Ledwidge M, O'Loughlin C, Conlon C, Patle A, et al. Diastolic heart failure: evidence of increased myocardial collagen turnover linked to diastolic dysfunction. *Circulation*. 2007 Feb 20;115(7):888-95.

<sup>70</sup> Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell*. 2011;43:904-914.

<sup>71</sup> Saxena A, Carninci P. Long non-coding RNA modifies chromatin: epigenetic silencing by long non-coding RNAs. *Bioessays*. 2011;33:830-839.

<sup>72</sup> Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2007, 8:23-36.

<sup>73</sup> Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116: 281-297.

<sup>74</sup> AW Tong, J Nemunaitis. Modulation of miRNA activity in human cancer: a new paradigm for cancer gene therapy? *Cancer Gene Therapy*(2008)15,341-355; 28 March 2008.

<sup>75</sup> Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. In *Nature*. vol.433, n° 7027, Febbraio 2005, pp. 769–73.

<sup>76</sup> Eulio A, et al. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 132:9, 2008.

<sup>77</sup> Small EM, Frost RJ, Olson EN. MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease. *Circulation*. 2010 Mar 2;121(8):1022-32.

<sup>78</sup> Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*. 2008 Dec 18;456(7224):980-4.

<sup>79</sup> Villar AV, Garcia R, Merino D, Llano M, Cobo M, Montalvo C, et al. Myocardial and circulating levels of microRNA-21 reflect left ventricular fibrosis in aortic stenosis patients. *International journal of cardiology*. 2013 Sep 10;167(6):2875-81.

<sup>80</sup> Anselm A Derda, Sabrina Thum, Johan M Lorenzen, Udo Bavendiek, Joerg Heineke, Britta Keyser, Manfred Stuhmann, Raymond C Givens, Peter J Kennel, Christian Schulze, Julian D Widder, Johann Bauersachs, Thomas Thum. Blood-based microRNA signatures differentiate various forms of cardiac hypertrophy. *International Journal of Cardiology* 196 (2015) 115-122.

<sup>81</sup> Eric N Olson. MicroRNAs as Therapeutic Targets and Biomarkers of Cardiovascular Disease. *PMC* 2014 Dec 30.

- 
- <sup>82</sup> S Dangwal, C Bang, T Thum. Novel techniques and targets in cardiovascular microRNA research. European Society of Cardiology 2011.
- <sup>83</sup> Kumarswamy R, Volkman I, Jazbutyte V, Dangwal S, Parkl DH, Thum T. Transforming Growth Factor- $\beta$ -Induced Endothelial-to-Mesenchymal Transition Is Partly Mediated by MicroRNA-21. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2012;; 32: 361-369.
- <sup>84</sup> Bonci D. MicroRNA-21 as therapeutic target in cancer and cardiovascular disease. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* (2010) 5:156–161
- <sup>85</sup> Da Costa Martins PA, De Windt LJ. miR-21: a miRaculous Socratic paradox. *Cardiovasc Res* 2010;87:397-400.
- <sup>86</sup> R Roncarati, C Viviani Anselmi, MA Losi, et al. Circulating miR-29a, among other up-regulated microRNAs, is the only biomarker for both hypertrophy and fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy J. Am. Coll. Cardiol. 63 (9) (Mar. 11 2014) 920-927.
- <sup>87</sup> Raquel Garcia, Ana V Villar, Manuel Cobo, Miguel Lano, Rafael Martin Duran, Maria A Hurlé, J Francisco Nistal. Circulating Levels of miR-133a Predict the Regression Potential of Left Ventricular Hypertrophy After Valve Replacement Surgery in Patients With Aortic Stenosis J Am Heart Assoc. 2013; 2: e000211.
- <sup>88</sup> Duisters RF, Tijssen AJ, Schroen B, et al. miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. *Circ Res*. 2009; 104:170.
- <sup>89</sup> Care A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, Bang ML, Segnalini P, Gu Y, Dalton ND, Elia L, Latronico MV, Hoydal M, Autore C, Russo MA, Dorn GW II, Ellingsen O, Ruiz-Lozano P, Peterson KL, Croce CM, Peschle C, Condorelli G. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med*. 2007; 13: 613-618.
- <sup>90</sup> Latronico MV, Costinean S, Lavitrano ML, Peschle C, Condorelli G. Regulation of cell size and contractile function by AKT in cardiomyocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1015: 250-260.
- <sup>91</sup> Guttman M, Rinn JL. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature*. 2012;482:339-346.
- <sup>92</sup> Carrieri C, Cimatti L, Biagioli M, Beugnet A, Zucchelli S, Fedele S, Pesce E, Ferrer I, Collavin L, Santoro C, Forrest AR, Carninci P, Biffo S, Stupka E, Gustincich S. Long non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through an embedded SINEB2 repeat. *Nature*. 2012;491:454-457.
- <sup>93</sup> Batista PJ, Chang HY. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. *Cell*. 2013;152:1298-1307.
- <sup>94</sup> Papait R, Kunderfranco P, Stirparo GG, Latronico MV, Condorelli G. Long noncoding RNA: a new player of heart failure? *J Cardiovasc Transl Res*. 2013;6:876-883.

- 
- <sup>95</sup> Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008;18:997-1006.
- <sup>96</sup> Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2014;42(Database issue):D68-D73.
- <sup>97</sup> Reuter JA, Spacek DV, Snyder MP. High-throughput sequencing technologies. *Mol Cell* 2015;58:586-597.
- <sup>98</sup> Young-Kook Kim. Extracellular microRNAs as Biomarkers in Human Disease. *Chonnam Med J*. 2015 Aug;51(2):51-57.
- <sup>99</sup> Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, Lorell BH, Aurigemma GP, Douglas PS. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation*. 1995 May 15;91(10):2642-54.
- <sup>100</sup> Nadir MA, Wei L, Elder DH, Libianto R, Lim TK, Pauriah M, et al. Impact of renin-angiotensin system blockade therapy on outcome in aortic stenosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011 Aug 2;58(6):570-6.
- <sup>101</sup> Christ M, Sharkova Y, Geldner G, Maisch B. Preoperative and perioperative care for patients with suspected or established aortic stenosis facing noncardiac surgery. *Chest* 128:2944, 2005.
- <sup>102</sup> Schwarz F, Baumann P, Manthey J, Hoffmann M, Schuler G, Mehmehl HC, et al. The effect of aortic valve replacement on survival. *Circulation*. 1982 Nov;66(5):1105-10.
- <sup>103</sup> Vahanian A, Alfieri O, Andreotti F, Antunes MJ, Baron-Esquivias G, Baumgartner H, et al. Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012): the Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *European journal of cardio- thoracic surgery: official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2012 Oct;42(4):S1-44.
- <sup>104</sup> Makkar RR, Fontana GP, Jilaihawi H, Kapadia S, Pichard AD, Douglas PS, et al. Transcatheter aortic-valve replacement for inoperable severe aortic stenosis. *The New England journal of medicine*. 2012 May 3;366(18):1696-704.
- <sup>105</sup> Smith CR, Leon MB, Mack MJ, Miller DC, Moses JW, Svensson LG, et al. Transcatheter versus surgical aortic-valve replacement in high-risk patients. *The New England journal of medicine*. 2011 Jun 9;364(23):2187-98.
- <sup>106</sup> Holmes DR, Mack MJ, Kaul S, Agnihotri A, Alexander KP, Bailey SR, et al. 2012 ACCF/AATS/SCAI/STS expert consensus document on transcatheter aortic valve replacement. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012 Mar 27;59(13):1200-54.
- <sup>107</sup> Lichtenstein SV, Cheung A, Ye J, et al. Transapical transcatheter aortic valve implantation



---

in humans: initial clinical experience. *Circulation* 2006;114(6):591-6.

<sup>108</sup> Ruge H, Lange R, Bleiziffer S, et al. First successful aortic valve implantation with the CoreValve ReValving System via right subclavian artery access: a case report. *Heart Surg. Forum* 2008;11(5):E323-4.

<sup>109</sup> Petronio AS, De Carlo M, Bedogni F, et al. Safety and efficacy of the subclavian approach for transcatheter aortic valve implantation with the CoreValve revalving system. *Circ. Cardiovasc. Interv.* 2010;3(4):359-66.

<sup>110</sup> Lardizabal JA, O'Neill BP, Desai HV, et al. The transaortic approach for transcatheter aortic valve replacement: initial clinical experience in the United States. *J Am Coll Cardiol.* 2013;61:2341-2345.

<sup>111</sup> Rodeals-Cabau J. Transcatheter aortic valve implantation: current and future approaches. *Nat. Rev.Cardiol.* 2012;9(1):15-29.

<sup>112</sup> Agarwal S, Tuzcu EM, Krishnaswamy A, et al. Transcatheter aortic valve replacement: current perspectives and future implications. *Heart* 2015;101(3):169-77.

<sup>113</sup> Nashef SA, Roques F, Michel P, Gauducheau E, Lemeshow S, Salamon R. European system for cardiac operative risk evaluation (EuroSCORE). *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 1999;16(1):9-13. Accessed January 17, 2015.

<sup>114</sup> O'Brien SM, Shahian DM, Filardo G, et al. The Society of Thoracic Surgeons 2008 cardiac surgery risk models: part 2-isolated valve surgery. *Ann. Thorac. Surg.* 2009;88(1 Suppl):S23-42.

<sup>115</sup> Goel SS, Ige M, Tuzcu EM, et al. Severe aortic stenosis and coronary artery disease implications for management in the transcatheter aortic valve replacement era: a comprehensive review. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013;62(1):1-10.

<sup>116</sup> Ferrari E, von Segesser LK. Transcatheter aortic valve implantation (TAVI): state of the art techniques and future perspectives. *Swiss Med. Wkly.* 2010;140:w13127.

<sup>117</sup> D'Errigo P, Barbanti M, Ranucci M, Onorati F, Covello RD, Rosato S, Tamburino C, Santini F, Santoro G, Seccareccia F. Transcatheter aortic valve implantation versus surgical aortic valve replacement for severe aortic stenosis: Results from an intermediate risk propensity-matched population of the Italian OBSERVANT study. *International Journal of Cardiology* Volume 167, Issue 5, 1 September 2013, Pages 1945-1952.

<sup>118</sup> Piazza N, Kalesan B, van Mieghem N, et al. A 3-center comparison of 1-year mortality outcomes between transcatheter aortic valve implantation and surgical aortic valve replacement on the basis of propensity score matching among intermediate-risk surgical patients. *J Am Coll Cardiol* 2013;6:443-451.

<sup>119</sup> Leon MB, Smith CR, Mack MJ, et al. Transcatheter or Surgical Aortic-Valve Replacement in Intermediate-Risk Patients. This article was published on April 2, 2016, at NEJM.org.

- 
- <sup>120</sup> Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, et al. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63:2438-88.
- <sup>121</sup> Hachicha Z, Dumesnil JG, Bogaty P, et al. Paradoxical low flow, low gradient severe aortic stenosis despite preserved ejection fraction is associated with higher afterload and reduced survival. *Circulation*. 2007;115:2856-64.
- <sup>122</sup> Minners J, Allgeier M, Gohlke-Baerwolf C, et al. Inconsistencies of echocardiographic criteria for the grading of aortic valve stenosis. *Eur Heart J*. 2008;29:1043-8.
- <sup>123</sup> Jander N. Low-gradient ‘severe’ aortic stenosis with preserved ejection fraction: new entity, or discrepant definitions? *Eur Heart J* 2008;10: E11-5.
- <sup>124</sup> Rosenhek R, Binder T, Porenta G, et al. Predictors of outcome in severe, asymptomatic aortic stenosis. *N Engl J Med* 2000;343:611e17.
- <sup>125</sup> Slotwiner DJ, Devereux RB, Schwartz JE, et al. Relation of age to left ventricular function in clinically normal adults. *Am J Cardiol* 1998;82:621-6.
- <sup>126</sup> Dumesnil JG, Shoucri RM, Laurenceau JL, Turcot J. A mathematical model of the dynamic geometry of the intact left ventricle and its application to clinical data *Circulation*. 1979 May;59(5):1024-34.
- <sup>127</sup> Dumesnil JG, Pibarot P, Carabello B. Paradoxical low flow and/or low gradient severe aortic stenosis despite preserved left ventricular ejection fraction: implications for diagnosis and treatment. *Eur Heart J*. 2010;31:281-9.
- <sup>128</sup> Eleid MF, Sorajja P, Michelena HI, et al. Flow-gradient patterns in severe aortic stenosis with preserved ejection fraction: clinical characteristics and predictors of survival. *Circulation*. 2013;128:1781-9.
- <sup>129</sup> Eleid MF, Sorajja P, Michelena HI, et al. Survival by stroke volume index in patients with low-gradient normal EF severe aortic stenosis. *Heart*. 2015;101:23-9.
- <sup>130</sup> Pierard LA, Dulgheru R. Evaluation of aortic stenosis: an update—including low-flow states, myocardial mechanics and stress testing *Curr Cardiol Rep*. 2015 Jun;17(6):42.
- <sup>131</sup> Lancellotti P, Magne J, Donal E, et al. Clinical outcome in asymptomatic severe aortic stenosis: insights from the new proposed aortic stenosis grading classification. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59:235-43.
- <sup>132</sup> Clavel MA, Dumesnil JG, Capoulade R, et al. Outcome of patients with aortic stenosis, small valve area, and low-flow, low-gradient despite preserved left ventricular ejection fraction. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60:1259-67.

- 
- <sup>133</sup> Kamperidis V, van Rosendael PJ, Ng AC, Katsanos S, van der Kley F, Debonnaire P, Joyce E, Sianos G, Marsan NA, Bax JJ, Delgado V. Impact of flow and left ventricular strain on outcome of patients with preserved left ventricular ejection fraction and low gradient severe aortic stenosis undergoing aortic valve replacement. *Am J Cardiol*. 2014 Dec 15;114(12):1875-81.
- <sup>134</sup> Jander N, Minners J, Holme I, et al. Outcome of patients with low-gradient “severe” aortic stenosis and preserved ejection fraction. *Circulation* 2011;123:887-95.
- <sup>135</sup> Dahl JS, Eleid MF, Pislaru SV, et al. Development of paradoxical low flow low gradient severe aortic stenosis. *Heart* 2015;101:1015-23.
- <sup>136</sup> Hachicha Z, Dumesnil JG, Pibarot P. Usefulness of the valvuloarterial impedance to predict adverse outcome in asymptomatic aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:1003-11.
- <sup>137</sup> Bergler-Klein J, Klaar U, Heger M, et al. Natriuretic peptides predict symptom-free survival and postoperative outcome in severe aortic stenosis. *Circulation*. 2004;109:2302-8.
- <sup>138</sup> Lancellotti P, Lebois F, Simon M, et al. Prognostic importance of quantitative exercise Doppler echocardiography in asymptomatic valvular aortic stenosis. *Circulation*. 2005;112:I377-82.
- <sup>139</sup> Pibarot P. Aortic Stenosis: Flow matters. *Heart* 2015;101:1 5-6.
- <sup>140</sup> De Filippi CR, Willett DL, Brickner E, et al. Usefulness of dobutamine echocardiography in distinguishing severe from nonsevere valvular aortic stenosis in patients with depressed left ventricular function and low transvalvular gradients. *Am J Cardiol*. 1995;75: 191-4.
- <sup>141</sup> Schwammenthal E, Vered Z, Moshkowitz Y, et al. Dobutamine echocardiography in patients with aortic stenosis and left ventricular dysfunction: predicting outcome as a function of management strategy. *Chest*. 2001;119:1766-77.
- <sup>142</sup> Pai RG, Varadarajan P, Razzouk A. Survival benefit of aortic valve replacement in patients with severe aortic stenosis with low ejection fraction and low gradient with normal ejection fraction. *Ann Thorac Surg*. 2008;86:1781-9.
- <sup>143</sup> Fougères E, Tribouilloy C, Monchi M, et al. Outcomes of pseudosevere aortic stenosis under conservative treatment. *Eur Heart J*. 2012;33:2426-33.
- <sup>144</sup> Armitage P, Berry G. *Statistica Medica*. Editore: Mc Graw-Hill Companies. 3/ed. Pubblicazione: 1996. Pagine: 650.
- <sup>145</sup> Colton T. *Statistica in Medicina*. Editore: Piccin. Pubblicazione: Padova, 1973.
- <sup>146</sup> Carabello BA, Paulus WJ. Aortic stenosis. *Lancet*. 2009 Mar 14; 373 (9667):956-66.

- 
- <sup>147</sup> Yarbrough WM, Mukherjee R, Ikonomidis JS, Zile MR, Spinale FG. Myocardial remodeling with aortic stenosis and after aortic valve replacement: mechanisms and future prognostic implications. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011; 143(3):656-64.
- <sup>148</sup> Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 35: 569-582.
- <sup>149</sup> Jellis C, Martin J, Narula J, Marwick TH. Assessment of nonischemic myocardial fibrosis. *J Am Coll Cardiol.* 2010 Jul 6; 56(2):89-97.134.
- <sup>150</sup> Di Bello V, Cucco C, Giannini C, Delle Donne MG. Myocardial tissue characterization and aortic stenosis. *J Am Soc Echocardiogr.* 2010 Oct; 23(10):1067-70.
- <sup>151</sup> Shah AS, Chin CW, Vassiliou V, Cowell SJ, Doris M, Kwok TC, et al. Left ventricular hypertrophy with strain and aortic stenosis. *Circulation*2014;130:1607-16.
- <sup>152</sup> Mor-Avi V, Lang RM, Badano LP, Belohlavek M, Cardim NM, Derumeaux G, et al. Current and evolving echocardiographic techniques for the quantitative evaluation of cardiac mechanics: ASE/EAE consensus statement on methodology and indications endorsed by the Japanese Society of Echocardiography. *European journal of echocardiography: the journal of the Working Group on Echocardiography of the European Society of Cardiology.* 2011 Mar; 12(3):167-205.
- <sup>153</sup> Lancellotti P, Moonen M, Magne J, O'Connor K, Cosyns B, Attena E, et al. Prognostic effect of long-axis left ventricular dysfunction and B-type natriuretic peptide levels in asymptomatic aortic stenosis. *Am J Cardiol.* 2010 Feb 1; 105(3):383-8.136.
- <sup>154</sup> Chin CW, Semple S, Malley T, White AC, Mirsadraee S, Weale PJ, et al. Optimization and comparison of myocardial T1 techniques at 3T in patients with aortic stenosis. *European heart journal cardiovascular Imaging.* 2014 May; 15(5):556-65.
- <sup>155</sup> Tanaka M, Fujiwara H, Onodera T, Wu DJ, Hamashima Y, Kawai C. Quantitative analysis of myocardial fibrosis in normals, hypertensive hearts, and hypertrophic cardiomyopathy. *Br Heart J.* 1986; 55: 575-581.
- <sup>156</sup> Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev.* 2011;91:827-887.
- <sup>157</sup> Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15:509-524.
- <sup>158</sup> Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One.* 2008;3:e3694.
- <sup>159</sup> Wang K, Yuan Y, Cho JH, McClarty S, Baxter D, Galas DJ. Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One.* 2012;7:e41561.
- <sup>160</sup> Moldovan L, Batte KE, Trgovcich J, Wisler J, Marsh CB, Piper M. Methodological

---

challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *J Cell Mol Med*. 2014;18:371-390.

<sup>161</sup> Haider BA, Baras AS, McCall MN, Hertel JA, Cornish TC, Halushka MK. A critical evaluation of microRNA biomarkers in non-neoplastic disease. *PLoS One*. 2014;9:e89565.

<sup>162</sup> A Haghikia, D Hilfiker-Kleiner. MiRNA-21: a key to controlling the cardiac fibroblast compartment? *Cardiovasc Res*, 82 (2009), pp. 1-3.

<sup>163</sup> Pibarot P, Dumesnil JG. Aortic stenosis: look globally, think globally. *JACC Cardiovascular imaging*. 2009 Apr;2(4):400-3.

<sup>164</sup> Villari B, Campbell SE, Hess OM, Mall G, Vassalli G, Weber KT, Krayenbuehl HP. Influence of collagen network on left ventricular systolic and diastolic function in aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol*. 1993;22:1477-1484.

<sup>165</sup> Alper Ozkan, Samir Kapadia, Murat Tuzcu, Thomas H Marwick. Assessment of left ventricular function in aortic stenosis. *Nature Reviews Cardiology* 8, 494-501 (September 2011).

<sup>166</sup> Pibarot P, Dumesnil JG. Assessment of aortic stenosis severity: check the valve but don't forget the arteries! *Heart*. 2007 Jul; 93(7):780-2.

<sup>167</sup> Emilsson K, Brudin L, Wandt B. The mode of left ventricular pumping: is there an outer contour change in addition to atrioventricular plane displacement? *Clin Physiol*. 2001 Jul;21(4):437-46.

<sup>168</sup> Patrizio Lancellotti, Julien Magne. Valvuloarterial impedance in aortic stenosis: look at the load, but do not forget the flow. 354-357 First published online: 9 May 2011.

<sup>169</sup> Mehrotra P, Jansen K, Flynn AW, et al. Differential left ventricular remodelling and longitudinal function distinguishes low flow from normal-flow preserved ejection fraction low-gradient severe aortic stenosis. *Eur Heart J* 2013;34:1906-14.

<sup>170</sup> Clavel MA, Messika-Zeitoun D, Pibarot P, et al. The complex nature of discordant severe calcified aortic valve disease grading: New insights from combined doppler-echocardiographic and computed tomographic study. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:2329-38.